



Université de Montréal

# Étude des voies de signalisation qui régulent l'homéostasie du PI(4,5)P<sub>2</sub>

par Maïssa Babouder

Programme de Biologie Moléculaire  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise (M. Sc) en Biologie Moléculaire  
Option générale

Janvier 2017

© Maïssa Babouder, 2017

## Résumé

Diverses mutations de l'inositol 5-phosphatase OCRL (OcculoCerebroRenal Lowe), empêchant la catalyse de la conversion du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate [PI(4,5)P2] en phosphatidylinositol 4 phosphate [PI(4)P], sont la cause du syndrome de Lowe. Cette maladie, à transmission récessive liée au chromosome X, affecte près de 1 garçon sur 500 000 et est caractérisée par des défauts oculaires, un retard mental et des problèmes rénaux. Notre laboratoire a démontré que OCRL était importante pour la division cellulaire et que sa déplétion induisait une perte de l'homéostasie du PI(4,5)P2 <sup>(1,2)</sup>. Le but de mes recherches est d'identifier des protéines interagissant fonctionnellement avec OCRL pour réguler l'homéostasie du PI(4,5)P2. Un criblage à haut débit par dsRNA, dans des cellules S2 de Drosophile, a été mis au point sur le plan expérimental ainsi qu'au niveau de l'analyse automatique des images obtenues par microscopie. La réalisation future de ce criblage permettra d'élucider les voies de signalisation impliquées dans le rétablissement de l'homéostasie du PI(4,5)P2 et représente un premier pas vers une meilleure compréhension du syndrome de Lowe.

**Mots-clés :** PI(4,5)P2, OCRL, syndrome de Lowe, multinucléation, dsRNA, criblage, cellules S2, cytokinèse, homéostasie, Drosophile

# Abstract

Mutations in the inositol 5-phosphatase OCRL (OcculoCerebroRenal Lowe), that prevent phosphatidylinositol 4,5-biphosphate [PI(4,5)P<sub>2</sub>] dephosphorylation cause a genetic disease named Lowe syndrome. This rare X-linked genetic disease has an estimated prevalence of 1 in 500 000 people and is characterized by congenital eye defects, mental retardation and renal disorders. Our laboratory has shown that OCRL is important in cell division and that its depletion leads to loss in PI(4,5)P<sub>2</sub> homeostasis<sup>2,3</sup>. The goal of my studies is to identify proteins that regulate PI(4,5)P<sub>2</sub> homeostasis by functionally interacting with OCRL. A high-throughput screen using dsRNA in *Drosophila* S2 cells is currently experimentally and analytically optimized. This screen would give us a better understanding on signalling pathways regulating PI(4,5)P<sub>2</sub> homeostasis and would be a giant step towards elucidating the cellular mechanisms underlying Lowe syndrome.

**Keywords :** PI(4,5)P<sub>2</sub>, OCRL, Lowe syndrome, multinucleation, dsRNA, screen, S2 cells, cytokinesis, homeostasis, *Drosophila*



# Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	4
Table des matières.....	5
Liste des tableaux.....	8
Liste des figures .....	9
Liste des abréviations.....	11
Remerciements.....	13
1. Introduction.....	14
Phosphoinositides .....	14
Rôles des PI.....	16
Régulation du cytosquelette d'actine .....	16
Prolifération cellulaire .....	18
Transduction du signal.....	18
Trafic membranaire.....	19
Définition de l'identité membranaire.....	21
Division cellulaire.....	21
PI et cancer.....	24
Cancer et polyploïdie .....	24
dOCRL contrôle l'homéostasie du PI(4,5)P2 et est nécessaire à la cytokinèse.....	25
Mécanisme d'action du dsRNA .....	27
Syndrome de Lowe et dOCRL.....	28
Structure de dOCRL .....	28
OCRL contrôle une étape-clé de l'autophagie.....	30
Problématique et objectifs de recherche .....	30
2. Matériel et méthodes.....	32
Culture des cellules S2.....	32

Culture des cellules Dmel .....	32
Production de la lignée stable Lyn-Myr-Palm-GFP .....	32
Amplification d'ADN par PCR .....	33
Production de dsRNA dOCRL.....	33
Traitement au dsRNA .....	33
Immunobuvardage .....	33
Immunofluorescence.....	34
Optimisation du marquage cellulaire .....	35
Microscopes et logiciels utilisés .....	35
3. Résultats.....	37
3.1 Détermination des conditions expérimentales pour une déplétion optimale de dOCRL par dsRNA .....	37
3.1.2 Utilisation de la double déplétion dOCRL/PI5-Kinase Skittles de la Drosophile comme contrôle pour une restauration du phénotype sauvage .....	42
3.2 Détermination des conditions analytiques optimales pour la détection de cellules multinucléées. ....	45
3.2.1 Optimisation du marquage cellulaire pour une meilleure détection par le logiciel .	47
3.2.2 Utilisation de différents logiciels d'analyse d'image pour une meilleure détection des cellules S2.....	53
3.2.3 Séparation automatisée des cellules S2 pour une meilleure détection automatique des cytoplasmes .....	55
3.2.4 Utilisation de la ConA pour rendre les cellules adhérentes et faciliter leur détection automatique.....	57
3.3 Plan expérimental détaillé des étapes du criblage génomique en dsRNA, dans des cellules S2 de Drosophile.....	59
3.4 Calcul du Z' afin d'estimer la robustesse de l'essai .....	61
3.4.1 Augmentation de l'écart entre les pourcentages de multinucléation des contrôles négatif et positif d'augmentation de la multinucléation pour augmenter la valeur du Z' .	63
3.4.2 Combinaison de plusieurs phénotypes différents afin d'augmenter la valeur des Z' .....	67

4. Discussion .....	70
5. Conclusion .....	72
Bibliographie.....	i
Séquences « building block » des différents logiciels d'analyse d'image utilisés .....	1

## Liste des tableaux

Tableau I. Optimisation du marquage cellulaire.....	35
Tableau II. Configurations du microscope Opera.....	36

## Liste des figures

Figure 1. Structure d'un PI <sup>5,6</sup> .....	14
Figure 2. Sites de phosphorylation et de déphosphorylation des phosphoinositides <sup>6,10</sup> .....	15
Figure 3. Exemple de l'implication du PI(4,5)P2 dans le changement morphologique cellulaire <sup>1,22</sup> .....	17
Figure 4. La composition en PI diffère d'une membrane à une autre <sup>11,25</sup> .....	19
Figure 5. Les PI-kinases/phosphatases agissent à différentes étapes de la cytokinèse <sup>22,35</sup> 22	
Figure 6. Schéma illustrant le mécanisme de répression d'un gène par ARNi <sup>2,32</sup> .....	27
Figure 7. Domaines fonctionnels de la PI 5-Phosphatase OCRL chez l'humain <sup>34,47</sup> ....	29
Figure 8. dOCRL est efficacement déplété avec un seul traitement de 2ug de dsRNA, pendant 6 jours, dans les cellules S2.....	39
Figure 9. La co-déplétion par dsRNA de dOCRL et Skittles restaure le niveau de multinucléation.....	43
Figure 10. Le logiciel <i>Harmony</i> ne détecte pas les cytoplasmes des cellules S2 de manière précise.....	46
Figure 11. Le marquage des cellules au Cell Mask Orange permet la meilleure détection par le logiciel <i>Harmony</i> .....	49
Figure 12. L'agrégation des cellules empêche le logiciel <i>Harmony</i> de détecter les cytoplasmes de manière précise.....	52
Figure 13. Le logiciel <i>Acapella</i> est celui qui permet la meilleure détection des cellules	54
Figure 14. La dilution 1/12 effectuée par le robot Biomek permet une bonne séparation des cellules S2 .....	56
Figure 15. La Con-A améliore la détection par le logiciel <i>Acapella</i> des cellules S2 marquées au Cell MASK Orange, sans altérer le pourcentage de multinucléation.....	58
Figure 16. Schématisation du plan expérimental optimisé pour le criblage en dsRNA à haut-débit dans les cellules S2.....	60

<b>Figure 17. Formule mathématique du <math>Z'</math> prenant en considération les moyennes des contrôles positifs et négatifs au numérateur et les écarts types des mêmes contrôles au dénominateur<sup>6,50</sup> .....</b>	<b>61</b>
<b>Figure 18. Les <math>Z'</math> calculés ne permettent pas la mise en place d'un criblage robuste...</b>	<b>62</b>
<b>Figure 19. La déplétion de Cent-<math>\beta</math> favoriserait l'activation de Arf1 et de la PI5-Kinase Skittles</b>	<b>64</b>
<b>Figure 20. La co-déplétion dOCRL et Cent-<math>\beta</math> augmente la valeur du <math>Z'</math> correspondant à l'augmentation du phénotype de multinucléation, mais reste plus basse qu'attendu ...</b>	<b>65</b>
<b>Figure 21. L'exploitation des différents phénotypes induits par la déplétion de dOCRL ne semble pas augmenter l'écart des valeurs obtenues pour les différentes conditions étudiées</b>	<b>68</b>

# Liste des abréviations

°C : Degré Celsius  
-OH : groupement « Hydroxyl »  
AGO2 : Argonaute 2  
Akt : Protéine Kinase B ou PKB  
ARNi : Acide ribonucléique interférent  
ARNm : Acide ribonucléique messenger  
Arf : « ADP Ribosylation Factor »  
BSA : « Bovine Serum Albumin »  
C : Carbone  
Ca<sup>2+</sup> : « Ions Calcium »  
Cent-β : « Centaurin-β »  
Con.A : Concanavalin-A  
DAG : « Diacylglycérol »  
DAPI : « 4'6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride »  
dOCRL : « drosophila Occulocerebrorenal Syndrome of Lowe »  
dsRNA : « double stranded ribonucleic acid »  
FBS : « Fœtal bovine serum »  
GAP : « GTPase-Activating Protein »  
GEF : « Guanine nucleotide Exchanging Factor »  
GFP : « Green fluorescent protein »  
GTP : « Guanosine Tri-Phosphate »  
GTPase : « Guanosine Tri-Phosphate hydrolase »  
IP3 : « Inositol tri-phosphate »  
l : Litre  
μg : Microgramme  
M : Molaire  
ng : Nanogramme  
OCRL-1 : « Occulocerebrorenal Syndrome of Lowe protein 1 »  
PI : « Phosphatidylinositol »  
PI3K : « Phosphatidylinositol 3 Kinase »  
PI3P : « Phosphatidylinositol 3 mono-phosphate »  
PI(3,4,5)P3 : « Phosphatidylinositol 3,4,5 tri-phosphate »  
PI4P : « Phosphatidylinositol 4 mono-phosphate »  
PI(4,5)P2 : « Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate »  
PFA : « Paraformaldéhyde »  
PKC : « Protéine Kinase C »  
PLC : « Phospholipase C »  
Rab : « Ras-related GTP-binding protein »  
RISC : « RNA-induced silencing complex »

RTK : « Récepteurs Tyrosine-Kinase »

S2 : « Schneider 2 »

Sktl : « Skittles »

WGA : « Wheat Germ Agglutinin »

Z' : Z-factor



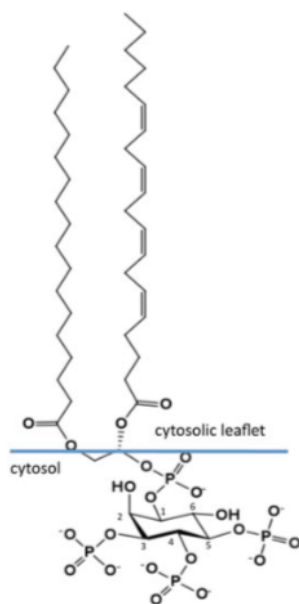
## **Remerciements**

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont épaulées, surtout les membres du laboratoire et mon directeur de recherche Sébastien Carreno. Une mention spéciale à Ben El Kadhi qui a su faire preuve de patience et de compassion. Je tiens également à remercier Haytham Mehzen et Josephine Chu pour leur support et leurs conseils judicieux. Pour terminer, j'aimerais souligner l'encouragement de ma famille et de mes amis. Vous m'avez permis de cheminer avec succès mon parcours aux cycles supérieurs.

# 1. Introduction

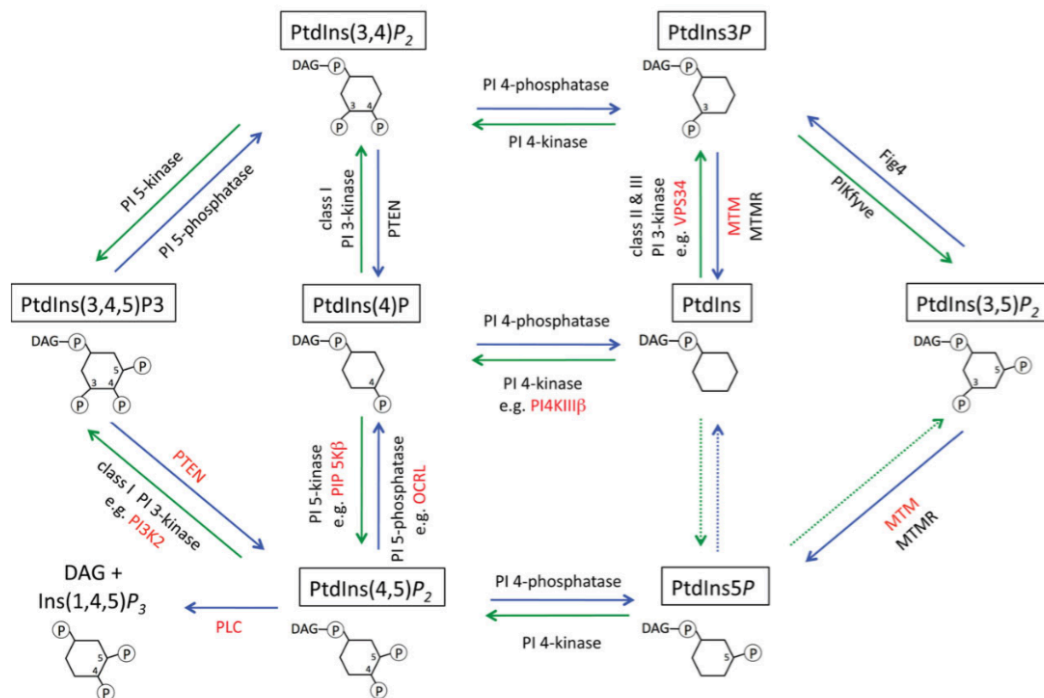
## Phosphoinositides

Bien que les phosphoinositides (PI) ne représentent qu'une faible fraction de l'ensemble des lipides cellulaires, ils ont néanmoins de nombreuses fonctions essentielles et vitales dans la cellule. Une structure moléculaire spécifique confère aux PI leurs propriétés respectives. En effet, ces lipides sont formés d'une « tête » hydrophile liée à des chaînes de carbone par un lien phosphodiester (Figure 1). La partie hydrophile est constituée d'un cycle inositol et est généralement associée au feuillet cytosolique de la cellule. Ce cycle est donc une molécule de sucre en conformation « chaise », contenant des groupement hydroxyl (-OH) liés aux C2 et C6 de l'hexose<sup>4,5</sup>.



**Figure 1.** Structure d'un PI <sup>5,6</sup>

La conformation de la molécule d'inositol permet la phosphorylation des groupements –OH en position 3, 4 et 5 du cycle uniquement. Il est donc possible, par jeu de phosphorylation/déphosphorylation par des kinases et phosphatases respectivement, de former jusqu'à 7 PI différents. Par exemple, un PI phosphorylé en positions 4 et 5 (PI(4,5)P<sub>2</sub>) peut être déphosphorylé en position 5 du groupement inositol par une 5-phosphatase, pour former du PI4P<sup>5,7-9</sup> (Figure 2).



**Figure 2.** Sites de phosphorylation et de déphosphorylation des phosphoinositides<sup>6,10</sup>

Les PI sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique par des PI synthases et sont ensuite distribués dans la cellule par trafic vésiculaire. L'identité des PI dépend de leur localisation cellulaire où, de manière générale, les mono-phosphorylés se situent sur les membranes des endosomes (endomembranes) ainsi que dans le Golgi alors que les PI bi- et tri-phosphates se situent à la membrane plasmique<sup>5,11</sup>. De multiples phosphorylations successives des PI ont lieu à la membrane plasmique suggérant que les PI sont fortement associés à cette dernière. Des études de marquage

cinétique de PI réalisées dans des érythrocytes ont montré que des cycles de phosphorylations/déphosphorylations rapides de PI(4,5)P2 et PI4P avaient lieu à la membrane plasmique<sup>12,13</sup>. Ceci indique qu'une déphosphorylation et re-phosphorylation des mono-phosphates peut avoir lieu à la membrane plasmique. Afin de maintenir un équilibre dans la cellule, il est important de dégrader l'excès de PI. De manière générale, le PI(4,5)P2 est éliminé par hydrolyse par des Phospholipase C (PLC) spécifiques. Cependant, le substrat de choix de la PLC est le PI(4,5)P2 qui est alors dégradé en Diacylglycérol (DAG) et Inositol tri-phosphate (IP3). Un équilibre dynamique entre phosphorylation et déphosphorylation des PI est donc maintenu dans la cellule (Figure 2). Cette homéostasie est essentielle au bon fonctionnement de la cellule.

## **Rôles des PI**

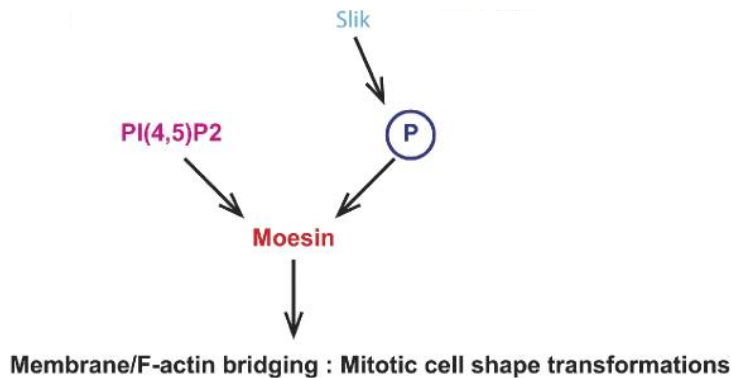
### **Régulation du cytosquelette d'actine**

Avant d'entamer cette partie, commençons par un rappel de ce qu'est le cytosquelette d'actine. La cellule maintient une forme qui lui est propre grâce à un échafaudage qu'est le cytosquelette. Celui-ci joue donc un rôle important dans toute activité cellulaire qui requiert un changement de la morphologie cellulaire. Le cytosquelette est composé de filaments flexibles que sont les filaments d'actine ou F-actine, de microtubules qui sont rigides et de filaments moins dynamiques que sont les filaments intermédiaires. Les filaments d'actine et les microtubules sont hautement dynamiques et permettent le remodelage physique de la cellule durant des processus vitaux comme la division et la migration cellulaire<sup>14,15</sup>.

Les premières cibles documentées des PI sont les protéines du cytosquelette. En 1985, Lassing I et al.<sup>16</sup> ont publié dans la revue Nature, la première preuve que le PI(4,5)P2 pouvait induire la polymérisation de l'actine<sup>8,14</sup>. En effet, le PI(4,5)P2 facilite l'élongation du filament d'actine à l'extrémité (+), c'est à dire celle où les monomères d'actine sont ajoutés, en induisant la dissociation des protéines liées à cette extrémité-ci<sup>14,17</sup>. Le PI(4,5)P2 régule l'addition d'actine à l'extrémité (+) en

activant la famille de protéines WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) qui à son tour active le complexe Arp2/3. Ce dernier médie la nucléation et l'embranchement de l'extrémité (+)<sup>3,10</sup>. Ceci est possible grâce à la liaison de WASP au PI(4,5)P2.

Étant donné que le PI(4,5)P2 est PI abondant dans les cellules, de nombreuses études se sont intéressées à sa capacité de recruter des protéines se liant au cytosquelette d'actine. De manière générale, les protéines se liant au PI contiennent un domaine qui sert de site de liaison aux lipides comme les domaines *pleckstrin homology* (PH) ou FYVE. La majorité de ces protéines se lient préférentiellement aux PI phosphorylés en position 3 de l'inositol. Cependant, certains sont plus spécifiques et se lient préférentiellement au PI(4,5)P2, par exemple. Ces protéines contiennent un domaine spécifique qu'est le domaine PH, PX ou encore tubby, un facteur de transcription<sup>3,18</sup>. Les PI recrutent donc des protéines qui se lient au cytosquelette d'actine régulant ainsi leur fonction<sup>8,17</sup>. Prenons pour exemple la moésine chez la Drosophile : son activation nécessite sa liaison au PI(4,5)P2 membranaire puis sa phosphorylation par la kinase Slik<sup>17,19</sup>. Cette activation induit un changement de conformation dévoilant ainsi les sites de liaison de la moésine aux filaments d'actine permettant ainsi un changement de morphologie cellulaire<sup>20,21</sup> (Figure 3).



**Figure 3. Exemple de l'implication du PI(4,5)P2 dans le changement morphologique cellulaire<sup>1,22</sup>**

Différentes kinases sont impliquées dans la production du PI(4,5)P2. Il existe les PI 5-kinases de type I (PIP5KI) qui phosphorylent le PI(4)P en position 4, les PI kinases de type II (PIP4KII) qui phosphorylent le PI(5)P en position 5, et les PI kinases de type III (PIP3KIII) qui phosphorylent le groupement inositol en position 3. Cependant, les PIP5KI sont celles qui contrôlent le cytosquelette d'actine. En effet, dans des cellules mammifères, la surexpression de PIP5KI induit des changements

importants de cytosquelette se traduisant par la polymérisation excessive d'actine<sup>3,23</sup>. La déplétion de la PI 5-Phosphatase (OCRL), d'une autre part, induit également l'accumulation de F-actin dans les cellules humaines<sup>4</sup>, montrant l'importance du PI(4,5)P2 dans la régulation du cytosquelette d'actine.

## **Prolifération cellulaire**

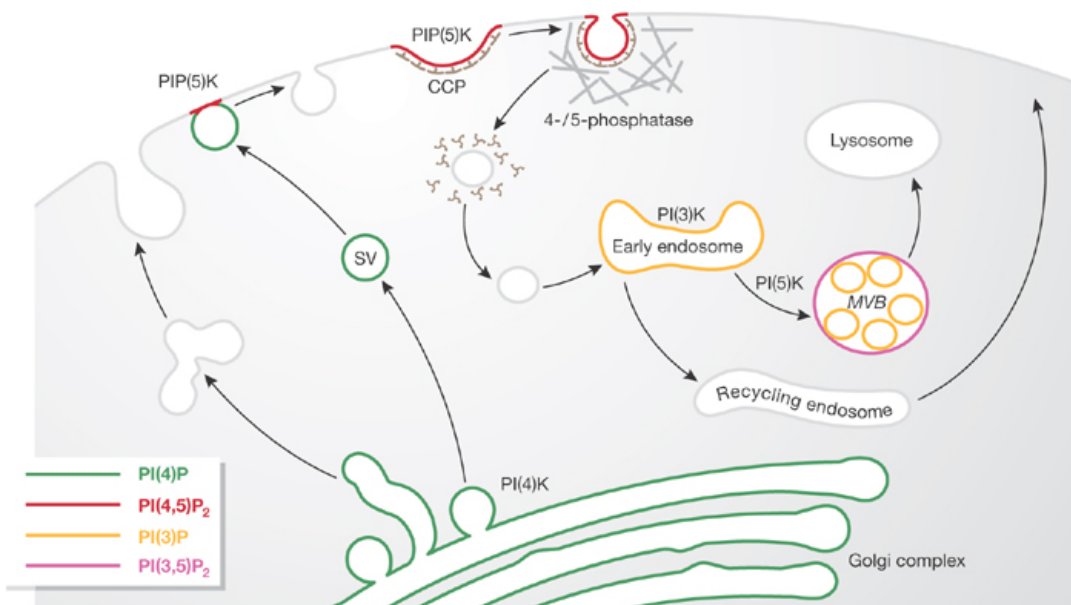
Comme mentionné plus haut, un équilibre dynamique entre les différentes formes phosphorylées des PI est nécessaire au bon fonctionnement de la cellule. Cet équilibre est maintenu par différentes PI-Kinases et PI-Phosphatases (Figure 2). Le métabolisme des PI passe donc par des cycles de phosphorylation/déphosphorylation appelés *turnover*. Une corrélation entre le *turnover* des PI et la prolifération cellulaire a été montrée par Fisher et Mueller en 1971<sup>24</sup>. En effet, par mesure de radioactivité, une diminution du *turnover* des PI est montrée lors de la différenciation cellulaire. Ceci suggère que les signaux de prolifération venant de la surface cellulaire à travers les récepteurs membranaires sont entre autres médiés par le métabolisme des PI. D'un autre côté, il a été montré qu'il était possible d'activer les PLC par deux voies distinctes, soit par l'activation des sous-unités des protéines G hétérotrimériques ou encore à travers l'activation des récepteurs tyrosine-kinase (RTK). Par conséquent l'activité de certains oncogènes est associée à l'activité des PI kinases. En effet, la kinase Akt, activée par la PI3 Kinase (PI3K) induit de nombreuses réponses cellulaires dont la prolifération<sup>5,21</sup>.

## **Transduction du signal**

Dans les balbutiements des connaissances sur les PI, la seule et unique fonction connue de ces derniers était la transduction de signaux. En effet, des molécules extracellulaires comme des facteurs de croissance par exemple, activent des RTK ou encore des récepteurs couplés aux protéines G. Ceci active la PLC qui hydrolyse alors le PI(4,5)P2 en DAG et IP3. Il en découle l'activation de nombreuses protéines comme la Protéine Kinase C (PKC) et la voie Ras MapK ainsi que le relargage des ions calcium Ca<sup>2+</sup> du réticulum endoplasmique. Le calcium cytoplasmique active alors des facteurs de transcription des gènes pro-inflammatoires comme NF- $\kappa$ B<sup>7-9,22</sup>.

## Trafic membranaire

Le trafic membranaire est le transport de molécules d'une membrane à une autre de la cellule. Ce processus est important notamment dans le cadre de l'internalisation de molécules dans la cellule (endocytose), le relargage de molécules ou de débris cellulaires (exocytose) ou encore dans la réutilisation de certains récepteurs membranaires (recyclage). Les PI, composants essentiels des membranes cellulaires, sont impliqués dans le trafic membranaire. Prenons l'exemple d'une endocytose où des vésicules entourées de PI(4,5)P<sub>2</sub> se forment sur la face cytosolique de la membrane plasmique (voir figure 4). Une fois formées, ces vésicules sont internalisées et peuvent par exemple fusionner avec des lysosomes ce qui permet de dégrader le contenu des vésicules. Notons qu'à l'étape où la vésicule devient un endosome, le PI(3)P devient le composant majeure de sa membrane. Ce changement ou *turnover* des PI est important et permet de donner une identité aux membranes (cet aspect sera discuté ultérieurement dans la partie « Introduction »). De nombreuses protéines comme les protéines Rab contrôlent les niveaux de PI et favorisent un fonctionnement adéquat du trafic membranaire <sup>10,21</sup>.



**Figure 4.** La composition en PI diffère d'une membrane à une autre <sup>11,25</sup>

La composition des membranes des endosomes précoces, similaire à celle de la membrane plasmique, est riche en cholestérol et phosphatidylsérine. Ceci s'explique par le fait qu'elles sont topologiquement les mêmes donc qu'elles communiquent entre elles. Les deux membranes sont cependant composées de différents PI. En effet, le PI(4,5)P<sub>2</sub> et le PI(3,4,5)P<sub>3</sub> se retrouvent majoritairement à la membrane plasmique alors que le PI(3)P est localisé sur les endosomes précoces (voir figure 4). Étant donné qu'un simple de jeu de phosphorylation/déphosphorylation permet de changer la composition en PI et que les membranes communiquent entre elles, il est probable que la composition spécifique des membranes soit due à une combinaison de *turnover* ainsi qu'un changement de localisation des PI grâce au trafic membranaire. L'activité ainsi que l'emplacement des PI kinases/phosphatases est donc nécessaire au maintien de l'homéostasie des PI.

Les niveaux de PI kinases et phosphatases varient d'un compartiment cellulaire à un autre. Cette hétérogénéité peut être observée par microscopie en fusionnant une protéine se liant spécifiquement à un PI donné, à une protéine fluorescente comme la GFP. En effet, ceci a permis d'établir une carte cellulaire montrant la localisation des différents PI à travers la cellule<sup>12,26</sup>. Étant donné la variation des niveaux de PI kinases/phosphatases d'un compartiment à un autre, on s'attend à ce que les PI ne soient pas distribués de manière homogène au niveau des membranes cellulaires. En effet, leur localisation membranaire dépend de leur interaction protéique et de leurs fonctions<sup>14,27</sup>.

Les protéines interagissent avec les PI à travers différents domaines comme les domaines PH, FYVE ou encore FERM<sup>14,28</sup>. Ces interactions sont de très faible affinité et nécessitent souvent la stabilisation du site de liaison<sup>14,29</sup>. Cette stabilisation est dépendante des *turnovers* lipidiques et de plusieurs molécules clé comme les petites GTPases Rab<sup>2,10</sup> et augmente la spécificité des interactions PI-protéines sur différentes membranes cellulaires<sup>18,30</sup>.

Les PI représentent une interface entre les membranes et le cytosquelette. En effet, l'assemblage des filaments d'actine accompagne l'endocytose de puits formés à partir de la membrane plasmique. Ceci corrèle avec les *turnover* de production/dégradation de PI(4,5)P<sub>2</sub><sup>17,31</sup>.



## Définition de l'identité membranaire

Les PI constituant les membranes ont la tête hydrophile en contact avec le cytosol. Leurs interactions avec les protéines cytosoliques se font ainsi à travers leur groupement inositol.

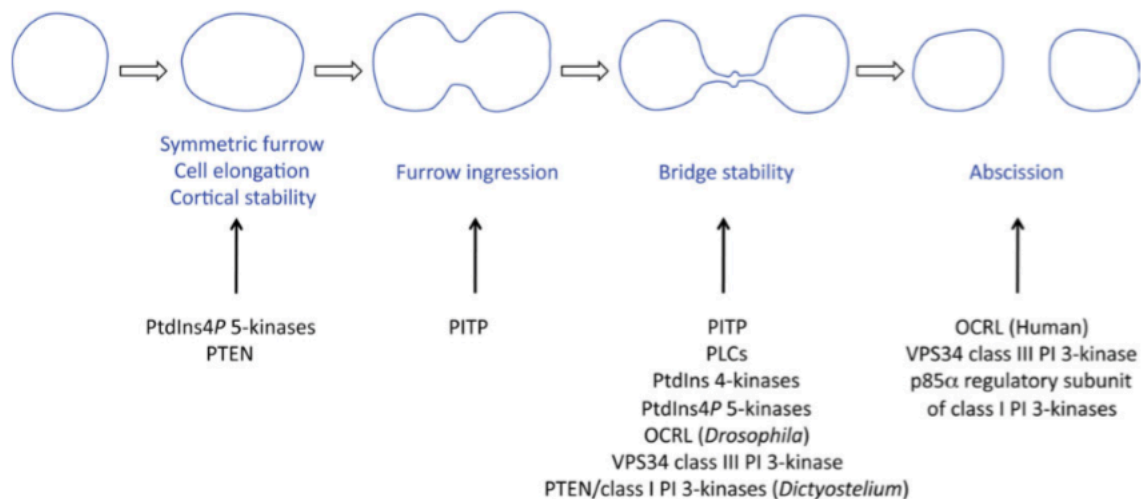
Comme mentionné plus haut, les membranes cellulaires sont composées de PI spécifiques leur conférant une identité qui leur est propre. Par exemple, PI(4,5)P<sub>2</sub> et le PI(3,4,5)P<sub>3</sub> sont localisés sur la membrane plasmique, le PI3P est restreint aux endomembranes alors que le PI4P se retrouve principalement sur les membranes du complexe Golgien (Figure 4) <sup>17,32</sup>. Les interactions des protéines cytosoliques avec les PI sont électrostatiques étant donné qu'elles ont lieu à travers le groupement inositol riche en groupements hydroxyl. Par conséquent, une membrane plasmique contenant plus de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> que de PI(4,5)P<sub>2</sub> fera d'avantage d'interactions électrostatiques avec les protéines cytosoliques et activera certaines voies de signalisation induisant une certaine réponse biologique. Prenons pour exemple des cellules épithéliales. Il est connu que ces cellules sont formées de membranes apicales et basolatérales. Le PI(3,4,5)P<sub>3</sub> est, de façon majoritaire, restreint à la surface basolatérale. Cette restriction est médiée par le *turnover* du PI(3,4,5)P<sub>3</sub> favorisée entre autres par la PI(3)K qui catalyse la phosphorylation du PI(4,5)P<sub>2</sub> en position 3 de l'inositol. Cette réaction est alors favorisée à celle catalysée par PTEN et qui consiste en la déphosphorylation du site 3 de l'inositol du PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. Le traitement de cellules épithéliales avec un inhibiteur de PI(3)K diminue la quantité de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> et réduit ainsi la surface de la membrane basolatérale. La membrane perd donc son identité. Par conséquent, la localisation et la quantité de PI sont à la base de la détermination de l'identité membranaire <sup>20,33</sup>.

## Division cellulaire

Lors de la division cellulaire, la cellule eucaryote animale subit des changements morphologiques. Ces derniers sont médiés par la réorganisation du cytosquelette et des lipides. Le PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, situé au cortex mitotique durant la division cellulaire, est nécessaire à l'orientation du fuseau mitotique (Figure 3). En effet, une augmentation ou une diminution de ce lipide corrèle avec une mauvaise localisation des protéines *dynactin*, cruciales à l'alignement des chromosomes et de l'organisation du fuseau mitotique<sup>23</sup>. L'orientation du fuseau mitotique est également affectée par la

quantité de PI(4,5)P<sub>2</sub>. Cependant, ce dernier est surtout impliqué dans l'arrondissement cellulaire nécessaire lors de la mitose. Cet arrondissement requiert l'activation des protéines Ezrin, Radixin et Moesin (ERM) qui relient la membrane plasmique aux filaments d'actine menant à la stabilisation des microtubules. L'interaction des ERM et du PI(4,5)P<sub>2</sub> qui résulte en une tension générée par la myosin créant donc une rigidité du cortex et une perte de l'adhésion focale cellulaire<sup>13,22</sup>. Il a été montré dans des cellules de *Drosophila* que lors de l'entrée en mitose, une activation soutenue de l'ERM détectée mène à un arrondissement cellulaire<sup>23,34</sup>.

Lors de l'élongation cellulaire associée à l'anaphase, des blebs sont observés dans des conditions sauvages. Ces blebs qui se forment et disparaissent grâce à la contraction acto-myosin sont nécessaires à la stabilisation du sillon de clivage lors de la cytokinèse. Un équilibre est nécessaire entre la formation et la dégradation de ces blebs et montre une fois de plus l'importance de remodelage du cytosquelette lors de la mitose<sup>2,4,19,21</sup>. Les ERM sont impliqués dans ce processus et rappelons que leur activation est dépendante du PI(4,5)P<sub>2</sub>. Par conséquent, une trop grande quantité de PI(4,5)P<sub>2</sub> mènerait à une suractivation des ERM donc à une rigidité corticale alors qu'une déplétion des ERM inhibe la rétraction des blebs et provoque une morphologie cellulaire anormale. Une déplétion de la PI 5-kinase Skittles impliquée dans la production du PI(4,5)P<sub>2</sub> chez la *Drosophila* réduit la quantité de PI(4,5)P<sub>2</sub> dans la cellule et entraîne un effet similaire<sup>21,34</sup>.



**Figure 5. Les PI-kinases/phosphatases agissent à différentes étapes de la cytokinèse**<sup>22,35</sup>

Le rôle des PI est surtout connu lors de la cytokinèse. En effet, le PI(4,5)P2 est le seul PI enrichi à la membrane plasmique, lors de cette dernière phase de la mitose <sup>2,21</sup>. Il est possible de quantifier le PI(4,5)P2 avec plusieurs sondes dont PLC $\delta$ -PH-Protéine fluorescente ou Tubby-Protéine fluorescente. La première sonde est sélective du domaine PH de la PLC et la seconde est un facteur de transcription dont l'extrémité C-terminale se lie au PI(4,5)P2.

La phosphorylation de PI4P par la PI 5-kinase est responsable de l'abondance du PI(4,5)P2 au sillon de clivage. En effet, cette kinase est abondante au sillon de clivage ainsi qu'au pont intercellulaire <sup>6</sup>. PTEN contribue également à l'élargissement du bassin de PI(4,5)P au sillon de clivage <sup>36</sup>. Même si cette contribution est minime, PTEN déphosphoryle le PI(3,4,5)P3 en position 3 pour générer du PI(4,5)P2. Il a été montré que la déplétion indirecte ou l'hydrolyse du PI(4,5)P2 induit un défaut de cytokinèse menant à des cellules binucléées <sup>37</sup>. Le PI(4,5)P2 est donc essentiel à la progression de la cytokinèse. Il a été montré que le PI(4,5)P2 interagissait avec des protéines impliquées dans la cytokinèse comme Anillin et Septin afin de stabiliser le cytosquelette d'actine. Étant donné que l'Anillin se lie à l'Actine, la Myosin et la Septin, elle est impliquée dans la formation de l'anneau contractile <sup>2,25</sup>. Rappelons que ce dernier a pour rôle de déformer la membrane plasmique en vue de la cytokinèse <sup>38</sup>. RhoA est également activé lors de la cytokinèse et est essentiel au maintien du sillon de clivage <sup>2,26</sup>. De par sa liaison en C-terminal au PI(4,5)P2, RhoA est stabilisé mais une fois l'invagination du sillon de clivage est avancée, le niveau de PI(4,5)P2 diminue induisant une diminution de la quantité de RhoA au sillon <sup>3</sup>. Par conséquent, PI(4,5)P2 contribue à la localisation au sillon de clivage, de protéines nécessaires à la cytokinèse.

## PI et cancer

### Cancer et polyploïdie

Lors de la phase G1 du cycle cellulaire, la cellule duplique son matériel génétique en vue de le transmettre à une cellule fille. Plusieurs points de contrôle durant le cycle cellulaire permettent d'assurer une réplication et division fidèles. Cependant, une fois la cytokinèse amorcée, il n'existe plus de point de contrôle. Par conséquent, si un échec de la cytokinèse survient, la cellule ne peut arrêter le processus de division afin de corriger la défaillance<sup>27</sup>.

De par leur rôle crucial au niveau de la cytokinèse, un défaut de l'homéostasie des PI peut mener à un défaut de la cytokinèse<sup>39</sup>. Il a été documenté qu'une surproduction de PI(4,5)P2 engendrait un problème d'abscission. Les cellules filles ne pouvant se séparer, le sillon de clivage se résorbe et les deux cellules filles fusionnent pour former une cellule contenant un matériel génétique dupliqué mais non séparé. Rappelons qu'une cellule somatique animale est diploïde (2N) c'est à dire qu'elle contient deux copies de chaque gène. Lors de la division cellulaire, cette même cellule double son matériel génétique (4N) pour ensuite en donner la moitié, de façon fidèle, à la cellule fille. Après la mitose, la cellule mère retrouve donc sa diploïdie. Cependant, si la séparation des cellules filles n'a pas lieu, la séparation du matériel génétique n'a donc également pas lieu. Après résorption du sillon de clivage, la cellule ayant échoué la cytokinèse se retrouve avec un matériel génétique dédoublé (4N) et devient alors tétraploïde, elle contient donc deux noyaux. Étant donné que dans les cellules somatiques des mammifères, il n'existe pas de point de contrôle en G1 spécifique des cellules polyploïdes ou multinucléées, cette même cellule peut donc tenter de se diviser de nouveau, sans aller en sénescence. Étonnamment, chaque noyau de la cellule binucléée peut dupliquer son matériel génétique et aller en mitose<sup>40</sup>. Ceci peut donc mener à de multiples fuseaux mitotiques séparés au sein d'une même cellule. Cette dernière devient alors octaploïde et ainsi de suite, jusqu'à ce que la mort cellulaire survienne.

Ce phénomène de polyploïdie est largement étudié car il peut induire une instabilité génomique qui peut mener au cancer<sup>27,41</sup>.

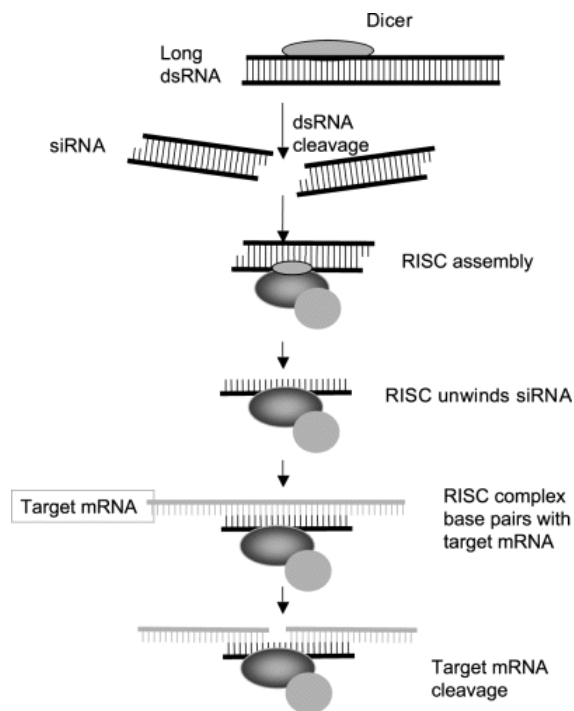
## **dOCRL contrôle l'homéostasie du PI(4,5)P2 et est nécessaire à la cytokinèse**

Le laboratoire du Dr. Sébastien Carreno s'intéresse aux rôles du cytosquelette dans la division cellulaire, plus précisément la régulation du PI(4,5)P2 durant la cytokinèse. Le laboratoire utilise majoritairement des cellules de mouche *Drosophila melanogaster* appelées cellules S2 ou Schneider 2. Les cellules S2 sont des cellules issues d'un embryon à un stade avancé de son développement (20 à 24 heures)<sup>28,42</sup>. Mis à part leur entretien facile (voir section « méthodologie »), ces cellules répondent bien au dsRNA<sup>29,34</sup>. En effet, il suffit simplement de rajouter une quantité adéquate d'ARN double brin dans le milieu de culture pour obtenir les effets escomptés, c'est-à-dire un phénotype induit par la déplétion du produit gène en question (le mécanisme d'action du dsRNA sera brièvement mentionné dans le paragraphe plus bas). Pour ces multiples raisons, le laboratoire du Dr. Carreno a utilisé les cellules S2 comme outil puissant afin de réaliser un criblage par dsRNA visant toutes les phosphatases, kinases des PI et phospholipases<sup>2,43</sup>. Tout candidat dont la déplétion induisait une augmentation de binucléation donc un échec de la cytokinèse était retenu. Une 5-phosphatase dont le gène est connu sous le nom de CG3573 chez la Drosophile était responsable, lorsque déplétée, d'une augmentation de près de 30% de la binucléation par rapport aux cellules non traitées. Le laboratoire s'est donc penché d'avantage sur cette phosphatase qui a un orthologue humain appelé OCRL-1 et l'ont alors nommée dOCRL pour OCRL chez la Drosophile. OCRL est une 5-phosphatase qui tire son nom de l'acronyme de la maladie causée par la mutation de OCRL. Ce sujet sera traité dans la section subséquente. Les cellules S2 traitées avec du dsRNA dirigé contre dOCRL étaient donc binucléées, plus grandes que les cellules non traitées, et comportaient des vacuoles. Ce phénotype impressionnant était quasiment aboli lorsque des cellules provenant de lignées stables exprimant mCherry-dOCRL non sensible au dsRNA contre OCRL étaient traitées avec ce dsRNA, montrant ainsi que le phénotype de binucléation est causé par la déplétion de dOCRL. Des lignées stables exprimant GFP-dOCRL sans activité phosphatase, traitées au dsRNA dirigé contre dOCRL avaient un taux élevé de binucléation montrant ainsi que l'activité phosphatase de dOCRL est nécessaire à la restauration de la cytokinèse. Après avoir montré que dOCRL était essentiel à la cytokinèse, Ben El Kadhi et al. ont montré que dOCRL colocalisait avec des marqueurs d'endocytose Rab et lorsque la phosphatase était déplétée, Rab5/7/11 se retrouvaient sur des vacuoles d'une taille anormalement grande. Par conséquent dOCRL

joue un rôle important dans le trafic endocytaire. Afin d'investiguer la rôle de dOCRL dans la cytokinèse, des cellules S2 provenant de lignées stables exprimant une sonde GFP-tubby sont utilisées pour permettre la localisation du PI(4,5)P2. En effet, étant donné que ce dernier est un lipide, il est impossible de le fusionner à une protéine fluorescente permettant sa détection. Une façon détournée de le localiser est de marquer un de ses partenaires de liaison. Dans ce cas-ci, tubby est le partenaire de liaison en question, est fusionné à une protéine fluorescente<sup>30,44</sup>. Grâce à cette sonde il a donc été possible de montrer que le PI(4,5)P2 se trouve généralement de façon uniforme à la membrane plasmique mais que lors de la cytokinèse, il était enrichi à l'anneau contractile, dans des cellules S2 sauvages. Le PI(4,5)P2 des cellules déplétées pour dOCRL se retrouve dans la cellule, sur des vésicules cytoplasmique ou endomembranes. Lors de la cytokinèse, le PI(4,5)P2 reste enrichi sur les endomembranes plutôt de se localiser sur l'anneau contractile. Ce dernier se détend et les cellules ne se séparent pas. Une quantification du ratio de PI(4,5)P2 localisé sur les endomembranes sur celui localisé à la membrane plasmique montre en effet que les cellules déplétées pour dOCRL ont une fois et demi plus de PI(4,5)P2 sur des endomembranes plutôt à la membrane plasmique, par rapport aux cellules contrôle. Il est possible de restaurer le phénotype en générant une lignée stable mCherry-dOCRL de cellules S2 et de les traiter par la suite au dsRNA dOCRL. Le ratio PI(4,5)P2 endomembrane sur membrane plasmique est alors de 1 prouvant que la déplétion de dOCRL est responsable de la localisation du PI(4,5)P2 sur les endomembranes. Étant donné que les cellules où dOCRL est déplété échouent la cytokinèse, Ben El Kadhi et al ont proposé que cet échec soit dû à la mauvaise localisation du PI(4,5)P2. Les auteurs ont également montré que certains composants de la machinerie de la cytokinèse comme RhoA, Anillin et la chaîne régulatrice de la myosine II se trouvent sur des endomembranes lors de la cytokinèse, au lieu de localiser à l'anneau contractile. Ceci montre donc que la déplétion de dOCRL cause un dérèglement spatio-temporel du PI(4,5)P2. Ce défaut d'homéostasie du PI(4,5)P2 affecte la machinerie de la cytokinèse et empêche donc les cellules de se séparer. Ces dernières deviennent multinucléées.

## Mécanisme d'action du dsRNA

Le dogme central de la biologie moléculaire postulé pour la première fois par Francis Crick stipule que l'ADN contient l'information génétique. Cette information est transcrite en ARN messager (ARNm) et traduite ensuite en protéine<sup>2,31</sup>. Il existe cependant un processus cellulaire connu sous le nom d'ARN interférent (ARNi) où l'expression du gène est réprimée par la dégradation de l'ARNm ou l'inhibition de la traduction de ce dernier en protéine. Une séquence d'ARN double brin appelée dsRNA médie cette répression du gène où une ribonucléase III du nom de Dicer, située dans le cytoplasme, hydrolyse le dsRNA en une molécule dsRNA de plus petite taille (figure 6).



**Figure 6.** Schéma illustrant le mécanisme de répression d'un gène par ARNi<sup>2,32</sup>

Cette petite molécule de dsRNA permet l'activation du complexe « RNA-induced silencing complex » (RISC) où l'endonucléase Argonaute 2 (AGO2), qui fait partie du complexe RISC, clive une extrémité du dsRNA. L'extrémité restante reste liée au complexe RISC et guide le complexe vers l'ARNm correspondant à la séquence du dsRNA. AGO2 clive alors l'ARNm<sup>33,45,46</sup>. Étant donné que le dsRNA ne cible que la séquence d'ARNm qui lui est complémentaire, ce processus est spécifique et peut être utilisé pour inhiber l'expression de protéines de manière ciblée. L'ARNi est très utilisé dans le domaine de la recherche en biologie moléculaire et de nombreuses recherches plus récentes convergent vers l'utilisation de l'ARNi en guise de thérapie contre le cancer et contre de nombreuses infections. Notons que lors de la répression d'un gène par dsRNA, l'expression du gène n'est pas complètement arrêtée mais est plutôt réduite. En effet, des niveaux endogènes de la protéine en question permettent une activité résiduelle. L'ARNi souvent engendre des effets *off-target* où un autre gène comportant une séquence assez similaire à celle du gène ciblé peut être réprimé. Afin de s'assurer que le gène désiré est celui qui est réprimé, un essai de restauration du phénotype sauvage est réalisé où le même dsRNA est utilisé pour cibler un gène qui est alors surexprimé dans une lignée de cellules transfectées.

## Syndrome de Lowe et dOCRL

### Structure de dOCRL

OCRL une protéine qui tient son nom de l'acronyme faisant référence au syndrome Occulo Cérébro Rénal de Lowe observé lors de la mutation du gène *ocr1*. En effet, OCRL est une PI 5-Phosphatase, ce qui veut dire qu'il s'agit d'une enzyme qui catalyse la déphosphorylation en position du groupement inositol du PI(4,5)P2 pour produire du PI(4)P. Par conséquent, une absence de fonction d'OCRL induit une accumulation de PI(4,5)P2 au détriment du PI(4)P (voir figure 2).

Le syndrome de Lowe est une maladie causée par des mutations du gène *ocr1*, situé sur le chromosome X à la position q25-26, codant pour la protéine OCRL-1. Touchant près de 1/500 000 garçons, le syndrome de Lowe se caractérise par une triade de cataracte, retard mental sévère et un



dysfonctionnement tubulaire proximal rénal <sup>13,36</sup>. Il existe de nombreuses variantes de cette maladie dues aux nombreuses mutations possibles du gène *ocrl*. En effet, les mutations sont généralement des délétions, changement du cadre de lecture ou encore la création d'un codon Stop. Ces mutations entraînent une déplétion du produit du gène *ocrl* et résultent donc en un manque d'activité de OCRL-1. Ceci mène donc à une accumulation de PI(4,5)P2 dans les cellules des patients. Chez l'humain, il existe une autre PI 5-phosphatase qui a un rôle similaire à OCRL-1 et qui porte le nom d'INPP5B et qui peut également déphosphoryler le PI(4,5)P2 en position 5 du groupement inositol. Cette redondance pourrait expliquer le fait que le phénotype observé chez l'humain est moins dramatique que celui observé dans les cellules de *Drosophila* par exemple. En effet, la mutation de OCRL-1 induit un retard important de l'abscission des cellules lors de la cytokinèse alors que la déplétion de dOCRL induit dans près de 30% des cas, un échec total de l'abscission.

Commençons par nous attarder sur la structure et la fonction de cette PI 5-phosphatase. Chez l'humain, OCRL est composée de 4 principaux domaines. Un domaine PH ou Pleckstrin Homology qui sert à la liaison d'OCRL aux lipides de la membrane, un domaine 5-phosphatase responsable de l'activité catalytique de l'enzyme, un domaine ASH en forme d'hélice et un domaine RhoGap catalytiquement inactif <sup>1,34</sup>.



**Figure 7. Domaines fonctionnels de la PI 5-Phosphatase OCRL chez l'humain** <sup>34,47</sup>

Il existe un nombre important de 5-phosphatases chez les mammifères dont les INPP5A/B/D/E/F/J/K et les Synaptojanin. Ces enzymes déphosphorylent toutes la 5<sup>ème</sup> position de l'inositol mais ont toutes des propriétés biochimiques différentes. En effet, certaines ont plus d'affinité pour les groupements inositol solubles et d'autres dépendent des ions  $Mg^{2+}$ . OCRL a un homologue appelé INPP5B avec près de 45% de similitudes au niveau de la séquence d'acides aminés. INPP5B interagit avec un grand nombre des interacteurs de OCRL. Cependant, OCRL comporte deux motifs de liaison à la clathrine (sur les domaines PH et RhoGAP) et un site de liaison AP-2 (entre les domaines PH et catalytique). Ces deux motifs sont inexistantes chez INPP5B et chez dOCRL.

## **OCRL contrôle une étape-clé de l'autophagie**

Une nouvelle fonction de OCRL est mise en avant par le groupe de de Mateis dans un article récent dans *Nature Cell Biology* <sup>35</sup> où les chercheurs affirment qu'OCRL joue un rôle important dans le maintien du flux autophagique. En effet, la déplétion de OCRL dans plusieurs lignées de cellules mammifères induit un enrichissement du PI(4,5)P2 sur les lysosomes et une inhibition d'un canal calcique impliqué dans la fusion d'autophagosomes aux lysosomes. Étant donné que cette fusion est nécessaire à la dégradation des autophagosomes et donc à l'autophagie, l'inhibition de cette étape arrête le flux autophagique et induit une accumulation d'autophagosomes et de lysosomes.

Cette découverte apporte des explications possibles aux observations faites par Ben El. Kadhi et al <sup>2</sup> où la déplétion de OCRL chez la *Drosophile* induisait une accumulation du PI(4,5)P2 sur des endomembranes. Ces endomembranes en question pourraient donc être des lysosomes et autophagosomes ce qui relierait possiblement le contrôle des niveaux du PI(4,5)P2 par dOCRL à l'autophagie, une avenue non exploitée auparavant.

Si OCRL contrôle la fusion des autophagosomes aux lysosomes, une restauration de cette fusion en absence de OCRL pourrait probablement restaurer l'homéostasie du PI(4,5)P2. En raison de contraintes de temps, cette avenue n'a pas été exploitée mais ne demeure pas moins plausible.

## **Problématique et objectifs de recherche**

La déplétion de dOCRL entraîne une accumulation de PI(4,5)P2 sur des endomembranes. Cette perte d'homéostasie induit un mauvais recrutement de la machinerie de la cytokinèse aux endomembranes plutôt qu'au sillon de clivage menant ainsi à l'échec de la cytokinèse <sup>2</sup>. La cellule ayant donc dupliqué son matériel génétique mais ayant échoué la séparation physique de la cellule-fille devient donc une large cellule binucléée. Si le processus est répété, à la division subséquente, la cellule devient trinuécléée etc.

Nous allons tirer profit de ce phénotype facile à observer qu'est la multinucléation pour cribler le génome de la *Drosophile* à la recherche d'interacteurs fonctionnels de dOCRL pouvant restaurer

l'homéostasie normale du PI(4,5)P2 ou encore aggraver le défaut d'homéostasie observé en absence de dOCRL. Pour ce faire, nous allons co-dépléter, un à un, les ~13 600 gènes de la *Drosophila* tout en déplétant dOCRL, par dsRNA. En se référant au pourcentage de multinucléation résultant de la déplétion de dOCRL, tout gène co-déplété induisant une modification de ce pourcentage, indiquerait une interaction génétique entre dOCRL et le gène déplété en question. Ainsi, toute augmentation ou diminution de multinucléation sera retenue.

Ce criblage constitue une première étape dans l'identification des voies de signalisation régulant l'homéostasie du PI(4,5)P2. En effet, il sera important, dans un deuxième temps, de confirmer les gènes retenus afin d'éviter les faux-positifs. Ceci est possible en utilisant une séquence différente de dsRNA pour cibler les mêmes gènes et les co-dépléter avec dOCRL. Ceci confirmerait que les gènes en questions interagissent génétiquement avec dOCRL. Cependant, dOCRL a de nombreuses fonctions au sein de la cellule. Il est donc important de vérifier si les gènes sélectionnés affectent directement l'homéostasie du PI(4,5)P2. Ainsi, la déplétion des gènes sélectionnés dans des cellules de la lignée stable tubby-GFP permet de localiser et quantifier toute variation du PI(4,5)P2.

Afin de réussir à identifier les régulateurs de l'homéostasie du PI(4,5)P2, il est nécessaire dans un premier temps de cribler le génome de la *Drosophila*, à la recherche d'interacteurs potentiels de dOCRL. Un projet d'une telle envergure requiert l'utilisation d'outils informatiques. En effet, compter le nombre de cellules multinucléées pour chacun des 13 600 gènes déplétés pourrait être une tâche fastidieuse. Il est donc important d'optimiser l'essai non seulement sur le plan expérimental mais également sur le plan analytique afin d'obtenir des résultats cohérents et reproductibles.

## 2. Matériel et méthodes

### Culture des cellules S2

Les cellules S2 sont maintenues dans un milieu de culture Schneider (Gibco 2172-024) 10% FBS (Gibco 12483-020) et 1% Pénicilline/Streptomycine (Bioshop PST999), à 27°C. Elles sont passées deux fois par semaine, à une concentration de  $2 \times 10^6$  cellules/mL de milieu de culture, dans une boîte T75 de marque Corning contenant un volume final de 12mL.

Décongélation : Les cellules S2 sont décongelées puis diluées dans 12mL de milieu de culture frais. Elles sont ensuite culotées par centrifugation 10 minutes à 100g et resuspendues dans 10mL de milieu de culture frais. Elles sont transférées dans une boîte T75 et conservées à 27°C.

Congélation : Le contenu de la boîte T75 en culture cellulaire (12mL) est culoté par centrifugation 10 minutes à 100g et le culot est resuspendu dans 10mL de FBS/10% DMSO (Bioshop DMS555) à 4°C. La solution contenant les cellules est ensuite transférée dans un cryotube de 1mL et est congelée de manière graduelle grâce à de l'isopropanol. La solution est ensuite transférée à -80°C.

### Culture des cellules Dmel

Les cellules sont maintenues dans du milieu Express 5 (Gibco 10486025) complémenté de L-Glutamine/Pénicilline/Streptomycine (Invitrogen 10378016) et maintenues à 27°C.

### Production de la lignée stable Lyn-Myr-Palm-GFP

$5 \times 10^6$  cellules sont transférées dans une flasque T25 contenant 8mL de milieu de culture Schneider/FBS/Pénicilline/Streptomycine frais et incubées 1 heure à 27°C. Dans un tube 1.5mL, 500uL de milieu *OptiMEM* (Invitrogen 31985070) sans sérum est ajouté à 15μL de *FUGENE* (Promega E2311). 5μg d'ADN (plasmide pAC-LynMyrPalm-GFP) est ajouté à la solution qui est alors incubée 15 minutes à température pièce avant d'être ajoutée à la culture cellulaire, dans la flasque T25. 3 jours plus tard, 600μL d'Hygromycine B (Invitrogen 10687010) est ajouté pour 100mL de culture cellulaire. Les cellules sont ensuite triées par cytométrie en flux afin de les séparer en fonction de leur niveau d'expression.

## Amplification d'ADN par PCR

25µL de solution *Sigma ReadyMix Taq PCR MgCl<sub>2</sub>* (Sigma P0476-20), 1µL d'amorces sens (TAATACGACTCACTATAGGGGATTGCCAATAATTGTCATCGC), 1µL d'amorces anti-sens (TAATACGACTCACTATAGGGGATTCTGAGTACTGATAGGG), 50ng d'ADN plasmidique (pOT-CG3573) et 22µL d'eau MilliQ ultrapure sont ajoutés dans un tube 0.2mL. Le programme SUPERMDS de la machine PCR *Eppendorf Master Cycles gradient* est utilisé.

L'ADN amplifié est alors purifié en utilisant le protocole de Bio Basic, *EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit* (BS664).

Programme SUPERMDS : 1) 2min à 94°C, 2) 30s à 94°C puis 30s à 63°C puis 1min à 72°C, 3) répéter l'étape 2) 35 fois, 4) 10min à 72°C

## Production de dsRNA dOCRL

L'ADN codant pour dOCRL est amplifié par PCR, purifié, et ensuite transcrit. Pour la transcription, le kit Promega P1320 est utilisé où 10µL de produit purifié de PCR est ajouté à 12µL de tampon *Express RiboMax T7 Buffer 2X* et 2µL d'enzyme *Express T7 enzyme mix* et incubé à 30°C durant la nuit. L'ADN est ensuite digéré en ajoutant 2µL de DNase du même kit et 78µL d'eau MilliQ ultrapure et incubé 30 minutes à 37°C.

## Traitement au dsRNA

Dans une plaque 96 puits, 10µL de dsRNA 0.2µg/µL sont ajoutés à 20x10<sup>3</sup> cellules en culture dans du milieu de culture frais, dans un volume total de 200µL par puits. Les cellules sont ensuite incubées à 27°C pendant 6 jours.

## Immunobuvardage

Préparation de l'échantillon : 1x10<sup>6</sup> cellules sont cultivées dans 2.5mL de milieu Schneider, dans une plaque 6 puits. Les cellules sont traitées au dsRNA et au sixième jour, elles sont récoltées, comptées, puis centrifugées à 1000g à 4°C pendant 2 minutes. 1mL de PBS 1X/ condition est ajouté aux cellules

qui sont centrifugées à nouveau à 1000g à 4°C pendant 2 minutes. 250uL de tampon RIPA 1x (Tris 100mM pH8.0, NaCl 300mM, NP-40 2% (Invitrogen 28324), Na-deoxycholate 1% (Invitrogen 89904), SDS 0.2% (Bioshop SDS003)) sont ajoutés pour chaque condition. Les échantillons sont incubés 20 minutes sur glace et vortexés toutes les 5 minutes. L'échantillon est ensuite centrifugé à 4°C pendant 10 minutes. Les protéines sont alors quantifiées par Bradford puis du Laemmli 2X préalablement chauffé (Tris-HCl 120mM, pH 6.8, Bleu de Bromophénol 0.02% (Sigma B0126), Glycérol 20%, SDS 10%, eau distillée) est ajouté. L'échantillon est alors chauffé à 95°C pendant 10 minutes.

Préparation du gel NuPAGE Bis-Tris, 4-12% (Invitrogen NP0321BOX) et transfert : Protocole NuPAGE Version E 2003.

Transfert des protéines sur membrane PVDF. La membrane doit être prélavée avec du méthanol puis rincée à l'eau et mise dans du tampon de transfert 1X NuPAGE. Assembler la membrane et le gel en « sandwich » puis mettre dans cellule à transfert avec tampon de transfert.

Blocage : La membrane est incubée dans une solution de lait 5% TBS-Tween (Tris-HCL 250mM pH8, NaCl 1.25M, Tween 20 1% (Sigma P9416)) pendant 1 heure, avec agitation. L'anticorps  $\alpha$ -dOCRL est dilué 1/500 dans une solution de lait 5% TBS-Tween. La membrane est alors incubée pendant 1 heure à 4°C, dans la solution contenant l'anticorps puis lavée 3 fois pendant 10 minutes avec du TBS-Tween. L'anticorps  $\alpha$ -tubulin 1/1000 dans du TBS-Tween, BSA 2% est préparé et la membrane est ensuite incubée à 4°C durant la nuit, dans la solution contenant l'anticorps. La membrane est alors lavée 3 fois 10 minutes dans du TBS-Tween et le processus est répété avec l'anticorps secondaire (dilution 1/10000, dans du TBS-Tween).

Révélation : ECL : 1mL de luminol et 1mL de peroxyde (Invitrogen 32106).

Exposition : 10 minutes

## **Immunofluorescence**

Les cellules sont fixées 30 minutes dans du PFA 4% (Cederlane 15710EM) puis lavées avec 200uL/puits de tampon TBS 1X (TBS 10X : Tris-HCl 200mM pH7.5 (Bioshop TRS001), NaCl 1540mM, EGTA 20mM pH8.0 (Bioshop EGT101.50), MgCl2 20mM (Bioshop MAG510)) et centrifugées à 100g pendant 10 minutes. Les cellules sont incubées à l'obscurité pendant 30 minutes dans 50uL/puits de Cell Mask Orange 1/10 000 (Invitrogen C10045) puis lavées avec du TBS 1X et centrifugées 10 minutes à 100g. Les noyaux sont marqués avec 50uL/puits de Dapi/ Mowiol 1/1000

(Dapi 0.1mg/mL dans de l'eau (Sigma D9542), Mowiol (Sigma 81381-250) (4.8g Mowiol, 12g Glycérol, 12mL eau distillée, 24mL Tris-HCl 0.2M pH8.5).

## Optimisation du marquage cellulaire

Tableau I. Optimisation du marquage cellulaire

Marquage cellulaire	Référence	Processus	Dilution
Phalloidin-Texas-Red	Invitrogen T7471	Fixation/perméabilisation/marquage	1/100
Cell Mask Orange	Invitrogen C10045	Fixation/marquage	1/10 000
$\alpha$ -tubulin-FITC	Sigma F2168	Fixation/perméabilisation/marquage	1/200
Wheat Germ Agglutinin-Alexa488	Invitrogen W11261	Marquage/fixation	1/200
Concanavalin A-Alexa 633	Invitrogen C21402	Fixation/perméabilisation/marquage	1/100
Lyn-Myr-Palm-GFP	Disponible au laboratoire	N/A	N/A

## Microscopes et logiciels utilisés

Perkin Elmer Operetta : High Content Imaging System

- Objectif: 20X long WD, O.N 0.45, distance: 6.6-7.8mm, profondeur du focus: 4.6um, résolution: 0.67um
- Filtres d'excitation utilisés: 380/40nm, 475/30nm, 535/30nm, 630/20nm
- Source de lumière: lampe de Xenon: 350-680nm, 600W
- Logiciel: Harmony
- Plaque 96 puits: CellStar de Greiner Bio-One

Perkin Elmer Opera: High Content Screening System LX

- Objectif: 20X eau,

- Source de lumière: Lampes UV et Xenon à haute pression
- Logiciel: Acapella
- Plaque 96 puits: ScreenStar de Greiner Bio-One

Tableau II. Configurations du microscope Opera

	Cell Mask Orange
Laser	561
Camera 1	520/35
Camera 2	660/150
Camera 3	475/34
Detection dichro	568
Primary dichro	405/488/561/640
UV excitation	390lp
UV emission	475
UV bandpass	405/10

Multidrop : ThermoFisher Scientific, Multi Drop Combi I

Biomek : Biomek FX (Beckman Coulter)



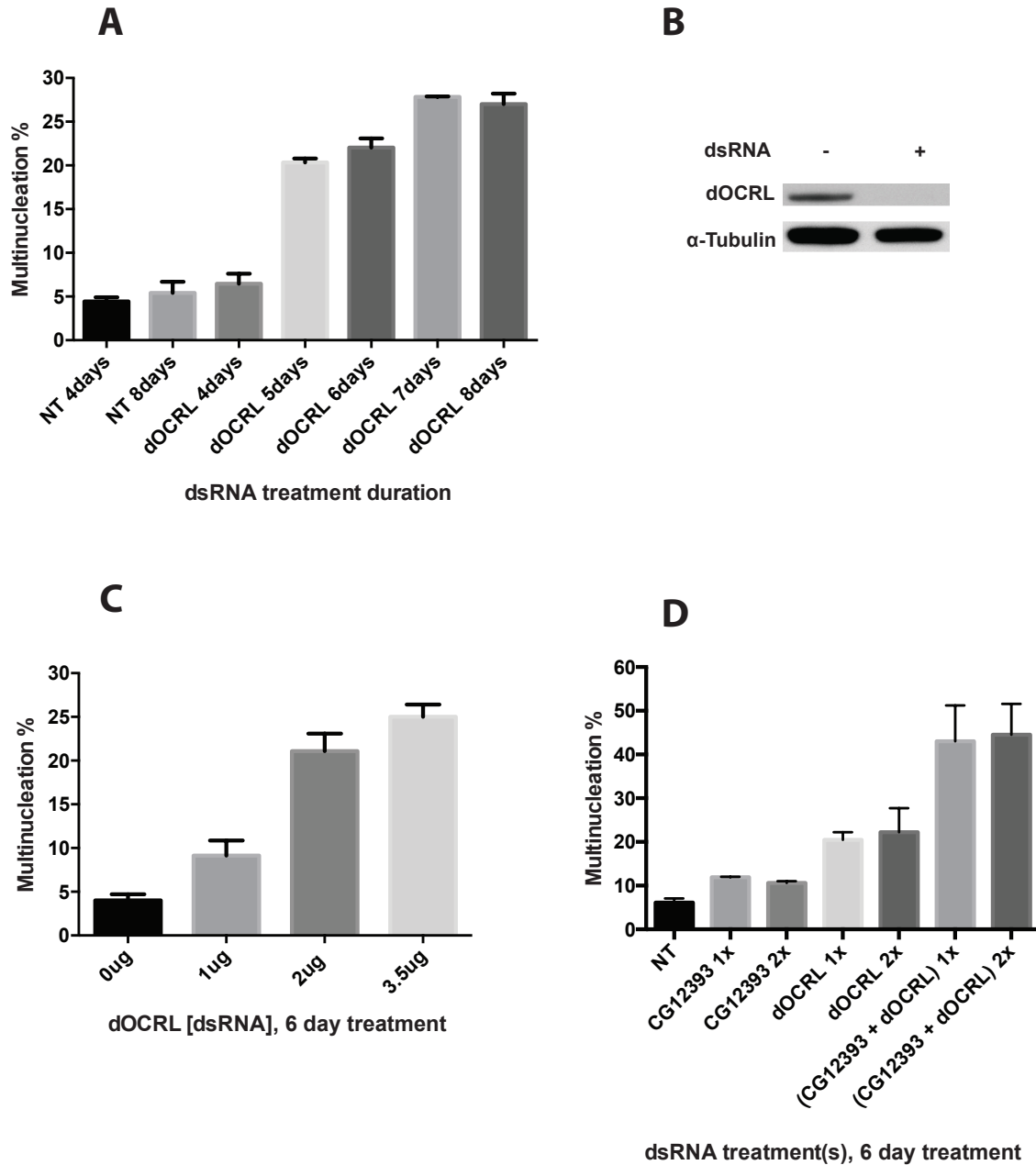
### 3. Résultats

Dans le but d'effectuer un criblage dsRNA sur l'ensemble du génome de la Drosophile, il est important d'optimiser les paramètres expérimentaux et analytiques de l'essai. Ceci permettrait l'obtention de résultats cohérents, reproductibles et réduirait les coûts engendrés par un projet d'une telle envergure.

#### 3.1 Détermination des conditions expérimentales pour une déplétion optimale de dOCRL par dsRNA

L'efficacité de la déplétion de dOCRL par dsRNA est testée afin d'obtenir, avec la quantité la plus petite de dsRNA, l'écart le plus grand entre les pourcentages de multinucléation des cellules non traitées (NT) et celles déplétées pour dOCRL. Pour ce faire, le temps d'incubation des cellules S2 en présence du dsRNA, la quantité de dsRNA ainsi que la fréquence des traitements sont testés (figure 8). Il est nécessaire d'abord de déterminer la durée du traitement des cellules S2 au dsRNA dOCRL. En effet, les cellules doivent internaliser les molécules de dsRNA et induire l'arrêt de la traduction ou la dégradation de l'ARNm ciblé. De plus, la cellule contient encore de la protéine active traduite avant le début du traitement. Par conséquent, la durée d'incubation des cellules en présence de dsRNA est optimisée en fonction du pourcentage de multinucléation induit. Les cellules sont donc traitées lors de leur ensemencement c'est à dire au jour 0, et trois jours après leur ensemencement. Elles sont ensuite fixées et marquées selon un protocole pré-établi au laboratoire, aux jours 4 à 8. Les images des cellules acquises au microscope sont ensuite analysées manuellement et le pourcentage de multinucléation est alors calculé (figure 8A). Notons que lors du criblage, pour chaque condition, les cellules seront traitées avec deux dsRNA différents : un dsRNA ciblant dOCRL et qui sera généré par le laboratoire du Dr. Carreno, et l'autre dsRNA ciblant un des gènes de la Drosophile et qui sera utilisé à partir d'une banque de dsRNA ciblant la majorité des transcrits de *Drosophila melanogaster* et disponible du la plateforme de criblage de l'Institut. Étant donné que certains de ces dsRNA pourraient atteindre leur efficacité optimale plus tôt, la durée d'incubation retenue est celle de 6 jours. En conclusion, après 6 jours de traitement au dsRNA dOCRL, le pourcentage de multinucléation est élevé. Il est ensuite

important de vérifier l'efficacité du dsRNA dOCRL sur les cellules S2 traitées, par immunobuvardage (figure 8B). Les cellules sont donc traitées au dsRNA selon un protocole pré-établi dans le laboratoire, et un anticorps généré au laboratoire contre dOCRL est utilisé afin de déterminer les niveaux d'expression de la phosphatase dOCRL dans ces cellules. Étant donné que les dsRNA ont préalablement été conçus dans le laboratoire du Dr. Carreno et que l'étude découlant de l'utilisation de ces dsRNA était publiée<sup>2</sup>, l'efficacité du dsRNA dOCRL était connue mais est alors confirmée ci-dessous (figure 8B). Dans le souci de minimiser la quantité de dsRNA nécessaire à l'obtention d'un pourcentage élevé de multinucléation, ce dernier est évalué par rapport à la quantité de dsRNA dOCRL utilisée (figure 8C). Afin de réduire cette quantité au strict minimum nécessaire, des quantités croissantes de dsRNA dOCRL sont testées. Il est ensuite intéressant de déterminer si, en faisant une double déplétion dOCRL et un autre gène, il était possible d'aggraver le phénotype de multinucléation par rapport à celui induit par la simple déplétion de dOCRL. Ceci pourrait servir de contrôle d'aggravation du phénotype dans le criblage prévu. Le groupe Giot. L et al. a montré en 2003, qu'une protéine peu connue, codée par le gène CG12393 chez la drosophile interagissait avec OCRL-1<sup>41 42 34</sup> grâce à son domaine C-terminal<sup>43</sup>. Les fonctions de CG12393 sont peu caractérisées, cependant, il est connu qu'elle joue un rôle dans le trafic membranaire<sup>44</sup>. En collaboration avec le laboratoire de Martin Lowe à Manchester University, notre laboratoire a démontré l'interaction fonctionnelle entre la protéine CG12393 et dOCRL. La double déplétion de dOCRL et de CG12393 conduit à un pourcentage de multinucléation plus élevé que lors de la simple déplétion de ces 2 protéines. La co-déplétion par dsRNA de dOCRL et CG12393 sera donc utilisée comme contrôle de l'aggravation du phénotype de multinucléation, dans le cadre de l'étude de la détermination de la fréquence optimale de traitement au dsRNA (figure 8D). Il était attendu que cette double déplétion induise un plus haut pourcentage de multinucléation que celui induit par la simple déplétion de dOCRL. Les résultats valident donc les attentes quant aux pourcentages de multinucléation. Cependant, dans cet essai, les cellules sont traitées une fois (1x) ou 2 (2x) avec du dsRNA afin de déterminer si un simple traitement de 2µg était suffisant pour induire un pourcentage de multinucléation satisfaisant. Le panneau D montre une légère différence de pourcentage de multinucléation entre 1 et 2 traitements, confirmant ainsi qu'un seul traitement de 2µg de dsRNA au jour 0 est suffisant pour induire un pourcentage de multinucléation sensiblement différent entre les conditions NT, dOCRL et la double déplétion. Pour les essais représentés dans les panneaux B, C et D, les cellules multinucléées sont détectées à l'œil nu à partir des images acquises par le microscope *Operetta* de Perkin Elmer.



**Figure 8. dOCRL est efficacement déplété avec un seul traitement de 2ug de dsRNA, pendant 6 jours, dans les cellules S2**

A) Le pourcentage de multinucléation augmente en fonction du temps d'incubation avec le dsRNA dOCRL, mais semble stagner autour de 30% après 7 jours. Il est convenu que 6 jours d'incubation étaient suffisants pour induire un pourcentage significatif de multinucléation. B) Après 6 jours de traitement, les cellules S2 sont lysées et l'équivalent de 16µg de protéines est mis sur gel et révélé dans le cadre d'un Immunobuvardage. Les cellules traitées au dsRNA dOCRL expriment significativement moins de dOCRL. C) Traiter les cellules pendant 6 jours

avec 2 $\mu$ g de dsRNA dOCRL 2 fois semble induire un phénotype satisfaisant de multinucléation. D) Un seul traitement de 2 $\mu$ g de dsRNA dOCRL suivi de 6 jours d'incubation donne le meilleur ratio phénotype induit/ ressources utilisées.

Il était attendu d'obtenir, après 6 jours de traitement au dsRNA dOCRL, près de 30% de multinucléation des cellules S2 <sup>2</sup>. Les résultats obtenus sont plus bas que ceux attendus en termes de multinucléation. En effet, après 6 jours de traitement, moins de 25% des cellules sont multinucléées. Cette différence peut-être due au fait que les images ont été acquises avec le microscope *Operetta* à un grossissement de 20X alors que dans l'étude réalisée par Ben El Kadhi et al, les images avaient été acquises au microscope *deltavision*, à un grossissement de 60X. Lors de l'essai représenté par les résultats ci-haut, il était plus difficile de déterminer si une cellule possédant deux noyaux juxtaposés, était effectivement multinucléée, ou bien il s'agissait d'une cellule ayant un noyau élargi. Il est également possible qu'étant donné que les cellules utilisées pour les deux essais n'étaient pas nécessairement au même passage, leur sensibilité au dsRNA soit différente. Notons qu'il semble également y avoir une légère augmentation du pourcentage de multinucléation entre les jours 7 et 8 montrant une certaine tendance de stagnation. Si l'essai avait pour unique but de déterminer la durée nécessaire d'incubation des cellules S2 en présence de dsRNA dOCRL pour l'obtention du plus haut pourcentage multinucléation, il aurait été possible de conclure que 7 jours d'incubation étaient nécessaires. Cependant, cet essai sert d'optimisation d'un criblage génomique où les gènes de drosophile seront co-déplétés grâce à un dsRNA provenant de la banque de la plateforme de criblage de l'Institut. Étant donné que le temps d'incubation nécessaire pour l'effet optimal des autres dsRNA n'est pas connu et varie d'un dsRNA à un autre, il est préférable d'écourter l'expérience. En effet, après 6 jours d'incubation, près de 22% des cellules S2 sont multinucléées. Ce pourcentage étant suffisamment plus élevé que le pourcentage de multinucléation des cellules non traitées (NT) ou sauvages 8 jours (6%), les cellules seront donc désormais traitées pour une durée de 6 jours. Dans le panneau B, il est possible d'observer une diminution de l'expression de la phosphatase dOCRL dans les cellules S2 traitées avec dsRNA dOCRL. Même si cette diminution est visible à l'œil nu, une quantification de l'intensité des bandes à l'aide du logiciel Image J aurait pu être réalisée afin d'estimer l'efficacité de la déplétion de manière quantitative. Par souci de temps, cette étape n'a pu être réalisée. Dans l'étude publiée<sup>2</sup>, les cellules S2 étaient traitées avec 3.5 $\mu$ g de dsRNA par traitement, pendant 6 jours. Cependant, il est possible d'obtenir un pourcentage de multinucléation élevé en utilisant 2 $\mu$ g de dsRNA dOCRL par traitement. Notons que lors de la réalisation du criblage, la plateforme de criblage de l'Institut utilise généralement 2 $\mu$ g de dsRNA de la banque par puits ou par 10 000 cellules. Étant

donné que, lors du criblage, les cellules seront traitées avec deux dsRNA différents, et afin d'éviter toute toxicité cellulaire ou saturation en dsRNA, il a été convenu que traiter les cellules avec 2µg de dsRNA dOCRL par traitement pour une durée de 6 jours était suffisant pour induire un phénotype de multinucléation suffisamment supérieur à celui des cellules NT (figure 8 C). Étant donné que la fonction de la protéine codée par le gène CG12393 est peu documentée, il aurait été préférable d'utiliser en guise de contrôle d'aggravation du phénotype, une phosphatase qui favoriserait la fabrication de PI(4,5)P2 (voir figure 9), comme PTEN. Cette avenue a été explorée dans notre laboratoire mais les résultats ne seront pas discutés dans ce mémoire. La déplétion de dOCRL aurait pu être réalisée dans des cellules surexprimant la PI 5-kinase de la Drosophile. L'utilisation de cellules transfectées dans le cadre d'un criblage n'a pas été retenue afin d'éviter l'introduction de biais liés à la favorisation d'une voie de signalisation à une autre. La figure 8D montre qu'un seul traitement de 2µg de dsRNA pour 10 000 cellules est suffisant pour induire un pourcentage élevé de multinucléation. En effet, le fait de traiter les cellules à deux reprises plutôt qu'une seule, ajoute une étape au protocole expérimental et augmente la possibilité d'erreurs, de biais et de facteurs de variations.

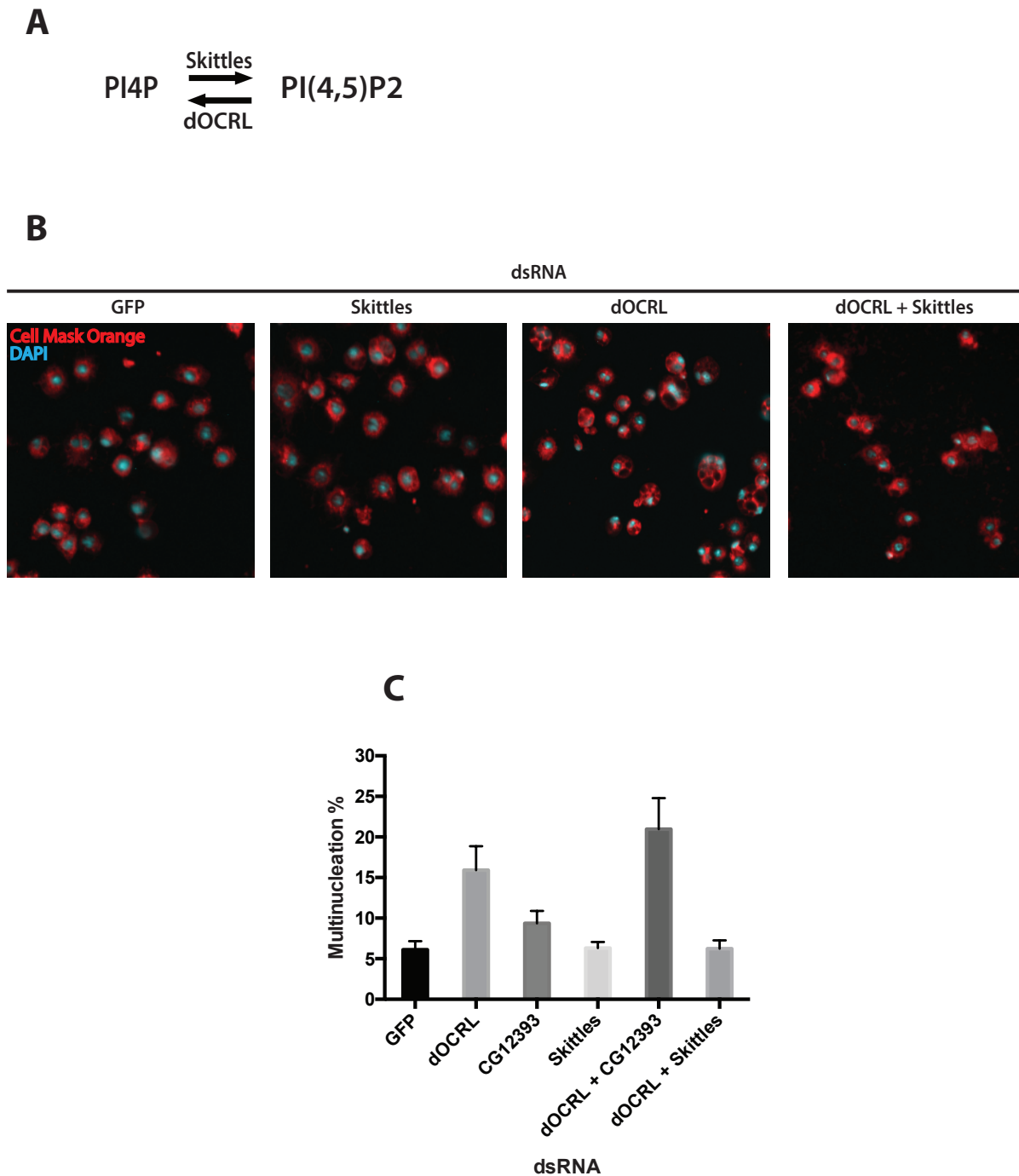
Les cellules S2 seront donc désormais traitées une seule fois avec 2µg de dsRNA dOCRL, pendant 6 jours. La double déplétion dOCRL et CG12393 servira de contrôle pour une aggravation du phénotype de pourcentage de multinucléation.

Une variation du phénotype de multinucléation dans le cadre du criblage prévu, pourrait indiquer une interaction fonctionnelle du gène déplété et de dOCRL, et nous aiderait à mieux comprendre les mécanismes de fonction et les rôles de dOCRL dans la cellule. Cependant le but de l'étude est de restaurer l'homéostasie du PI(4,5)P2, dans des conditions où dOCRL est sous exprimé. Pour ce faire, un contrôle où le phénotype de multinucléation est restauré nous aiderait à mieux identifier les gènes candidats interagissant génétiquement avec dOCRL, qui restaureraient le phénotype sauvage. Il est naturel de penser en premier lieu à co-dépléter dOCRL et la PI-5 kinase qui lui est complémentaire, c'est à dire Skittles chez la Drosophile (figure 9A).

### **3.1.2 Utilisation de la double déplétion dOCRL/PI5-Kinase Skittles de la Drosophile comme contrôle pour une restauration du phénotype sauvage**

Nous avons montré plus haut, que la co-déplétion par dsRNA de dOCRL et CG12393 entraîne une augmentation du phénotype de multinucléation. La co-déplétion de dOCRL (PI5-Phosphatase) et de la 5-kinase qui lui est complémentaire devrait entraîner une diminution de ce phénotype. Chez la Drosophile, cette kinase se nomme Skittles et catalyse la phosphorylation du PI(4)P en 5<sup>ème</sup> position de l'inositol, produisant du PI(4,5)P2. Une diminution du phénotype permettrait, dans le cadre du criblage en question, de détecter les protéines interagissant avec dOCRL qui pourraient rétablir l'homéostasie du PI(4,5)P2. Il est cependant nécessaire de vérifier, en premier lieu, si la co-déplétion par dsRNA, de dOCRL et Skittles sauve le phénotype de multinucléation par rapport au phénotype découlant de la simple déplétion de dOCRL (figure 9 panneaux A et B).

Les cellules S2 sont traitées selon les conditions établies plus haut.



**Figure 9. La co-déplétion par dsRNA de dOCRL et Skittles restaure le niveau de multinucléation**

A) Représentation schématique des enzymes PI 5-kinase (Skittles) et PI 5-phosphatase (dOCRL) chez la Drosophile, impliquées dans la production et la dégradation du PI(4,5)P2. B) Les cellules traitées au GFP dsRNA et celles déplétées pour Skittles seulement semblent avoir

un phénotype similaire, contrairement aux cellules traitées au dsRNA dOCRL qui semblent multinucléées. Ces dernières sont larges et contiennent des structures ressemblant à des vacuoles tel qu'attendu <sup>2</sup>. Les cellules où dOCRL et Skittles sont co-déplétés semblent plus petites et moins nombreuses mais celles déplétées pour GFP mais ne semblent pas multinucléées et ne contiennent pas de larges structures vacuolaires apparentes. La co-déplétion dOCRL et Skittles semble sauver le phénotype de multinucléation. C) Quantification manuelle des images recueillies dans l'essai représenté en B. Ceci valide donc que la co-déplétion dOCRL et Skittles sauve le phénotype de multinucléation et peut servir comme contrôle de 'suppression' du phénotype en question.

Il est attendu que la co-déplétion des deux 5-kinase et phosphatase agissant sur les niveaux de PI(4,5)P<sub>2</sub> aient un effet qui annulerait le phénotype causé par la déplétion de dOCRL (figure 9A). En effet, lorsque dOCRL est moins exprimé dans les cellules, ces dernières produisent moins de PI4P. L'équilibre est donc perdu. Lorsque Skittles est également moins exprimé dans les cellules, induisant une diminution de l'expression de PI(4,5)P<sub>2</sub> et rétablissant potentiellement l'homéostasie du PI(4,5)P<sub>2</sub>. Étant donné que la multinucléation est une manière indirecte de détecter la perte de l'homéostasie du PI(4,5)P<sub>2</sub>, le rétablissement du phénotype sauvage indique potentiellement un rétablissement de l'homéostasie du PI(4,5)P<sub>2</sub>. Les cellules co-déplétées pour dOCRL et Skittles ont un taux de multinucléation similaire à celui des cellules traitées au GFP dsRNA (figure 9B). Cette dernière condition sert de contrôle montrant que l'ajout de dsRNA n'altère pas le phénotype des cellules et n'induit pas de multinucléation. Le phénotype observé dans les autres conditions est donc attribuable à la séquence dsRNA utilisée ciblant un/deux ARNm spécifiques et non au simple ajout de molécules de dsRNA. Les cellules co-déplétées sont moins nombreuses mais ne semblent pas multinucléées et ne semblent pas contenir de structures vacuolaires (figure 9B). Il est important de confirmer cette diminution de multinucléation en quantifiant les images acquises au microscope lors de l'essai représenté dans le panneau B. La quantification manuelle montre que les cellules traitées aux dsRNA dOCRL et Skittles sont moins multinucléées que celle traitées au simple dOCRL dsRNA (figure 9C). En effet, les cellules co-déplétées ont un pourcentage de multinucléation se rapprochant de celui des cellules traitées au GFP dsRNA. Il est cependant important de noter que le pourcentage de multinucléation des cellules traitées au simple dOCRL dsRNA est légèrement moins élevé que celui observé pour la même condition, dans la figure 8. Cette diminution de multinucléation peut être due aux cellules, étant donné que le même dsRNA a été utilisé. En effet, rappelons que traiter les cellules aux dsRNA n'altère pas la séquence d'ADN donc n'affecte pas le gène. Il entraîne une diminution de l'expression du gène ciblé en diminuant la quantité d'ARNm codant pour le gène en question. Par conséquent, si les cellules sont plus vieilles ou moins bien entretenues, l'effet que peut avoir le dsRNA



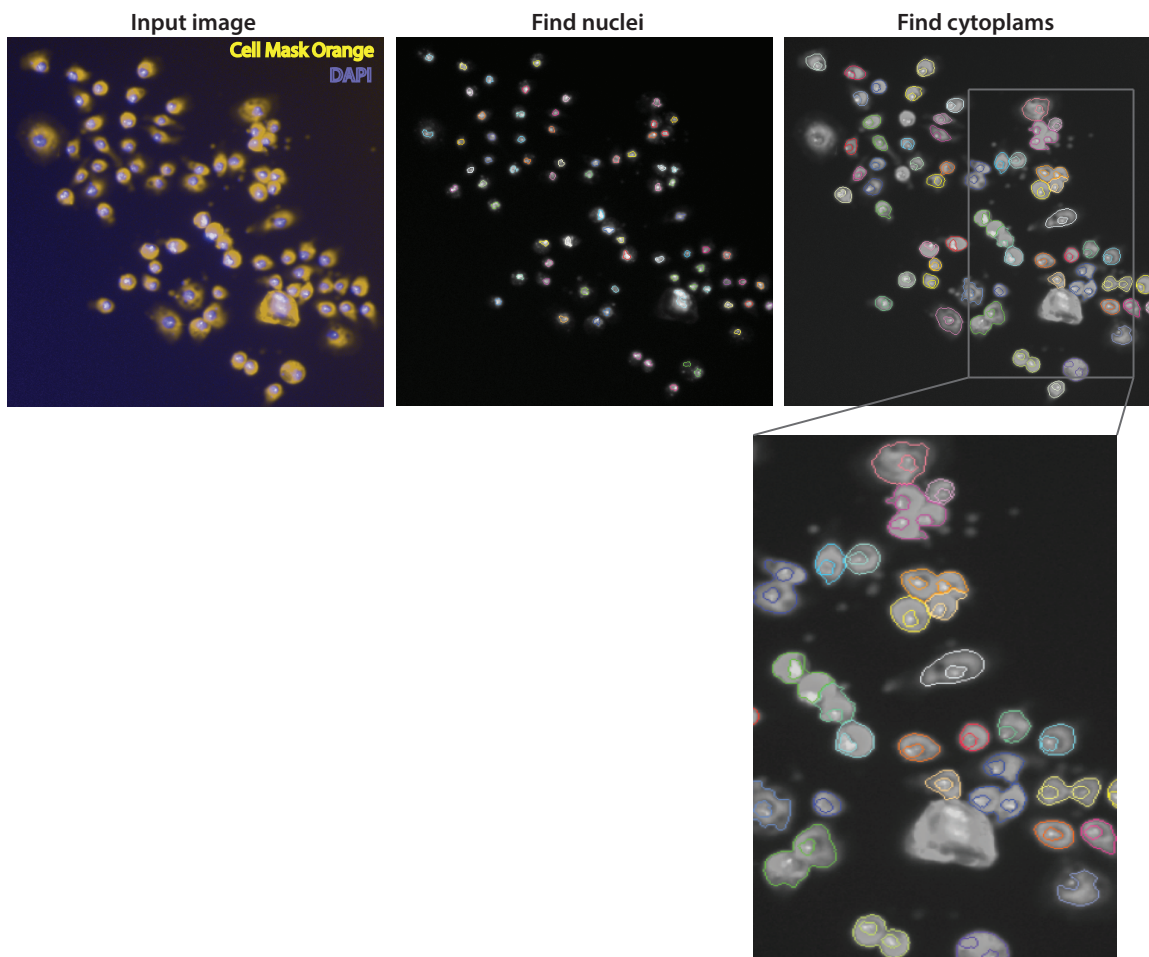
sur elles peut changer. Étant donné que la diminution de multinucléation est légère, elle ne sera pas prise en considération.

Par souci de concision, les résultats illustrant la mise en place de méthodes de culture cellulaire contrôlées ne sont pas montrés dans ce mémoire.

Les conditions expérimentales semblent maintenant optimisées pour le criblage. Cependant, la quantité de données potentiellement recueillies suite au criblage nous mène vers l'automatisation de l'analyse des images acquises au microscope, par un logiciel informatique.

### **3.2 Détermination des conditions analytiques optimales pour la détection de cellules multinucléées.**

Afin de réaliser un criblage à haut débit, il est important de déterminer les paramètres analytiques pour une interprétation adéquate des résultats expérimentaux. En effet, le génome de la *Drosophila* comprend près de 13 600 gènes qui seront un à un co-déplétés avec dOCRL, par dsRNA. L'analyse manuelle d'une telle quantité d'images générées suite à ces déplétions peut s'avérer fastidieuse. Une quantification automatique par un logiciel informatique d'analyse d'images est donc de mise. Il est cependant important d'optimiser les paramètres du logiciel en question, en fonction des conditions expérimentales utilisées. Un des microscopes automatisé pouvant calculer le pourcentage de multinucléation, disponibles à la plateforme de criblage de l'Institut est l'*Operetta* de Perkin Elmer, qui est couplé au logiciel *Harmony*. Les cellules S2 sont donc traitées au dsRNA dOCRL, selon les conditions déterminées plus haut. Les images acquises par le microscope sont ensuite analysées par le logiciel où les noyaux marqués au DAPI suivis des cellules marquées au Cell Mask Orange, un marqueur membranaire, sont détectés (figure 10).



**Figure 10. Le logiciel *Harmony* ne détecte pas les cytoplasmes des cellules S2 de manière précise**

Les images sont analysées par le logiciel Harmony selon les paramètres définis dans la section Matériel et Méthodes.

Dans un premier temps, le logiciel Harmony importe l'image acquise par le microscope Operetta (input image), puis détecte les noyaux marqués, ici, au Dapi (find nuclei) (figure 10). Chaque noyau détecté est donc entouré d'un cercle d'une couleur différente. Ceci permet de montrer s'il existe plusieurs noyaux que le logiciel détecte comme étant un seul noyau, ou encore des noyaux qui n'ont pas pu être détectés. Ceci pourrait survenir dans le cas où le marquage nucléaire n'est pas assez fort entrainant un faible contraste entre le noyau et le fond, ou bien la forme du noyau. En effet, un défaut de marquage pourrait entrainer une forme nucléaire aberrante. Le logiciel optimisé détecte une forme non circulaire et/ou une taille anormalement grande/petite et l'exclue de l'analyse. La forme aberrante apparait donc

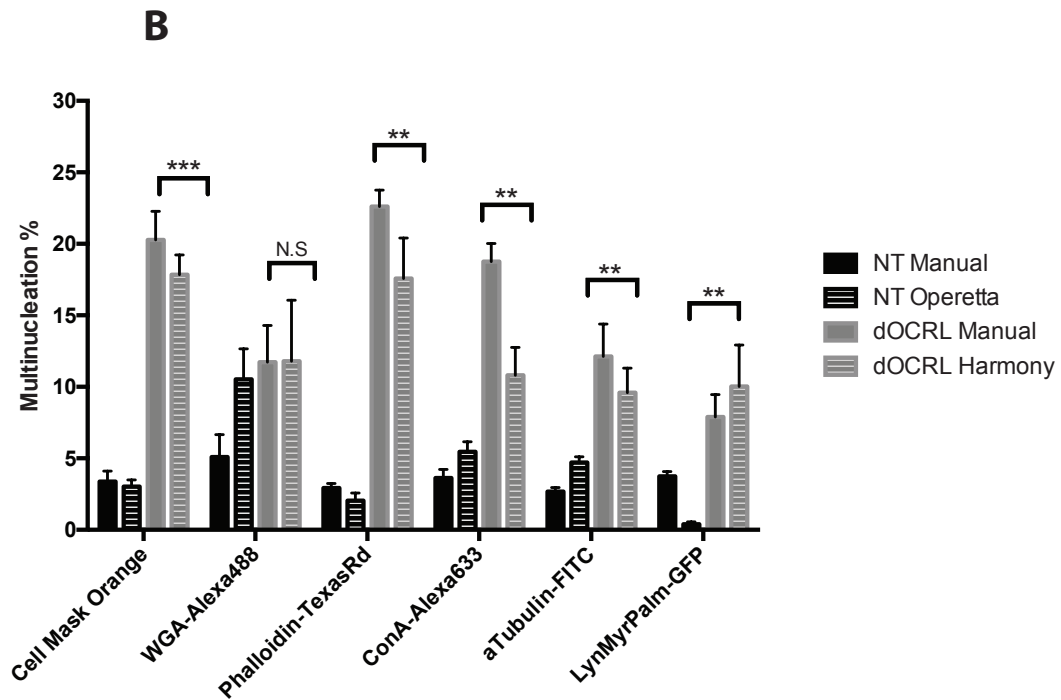
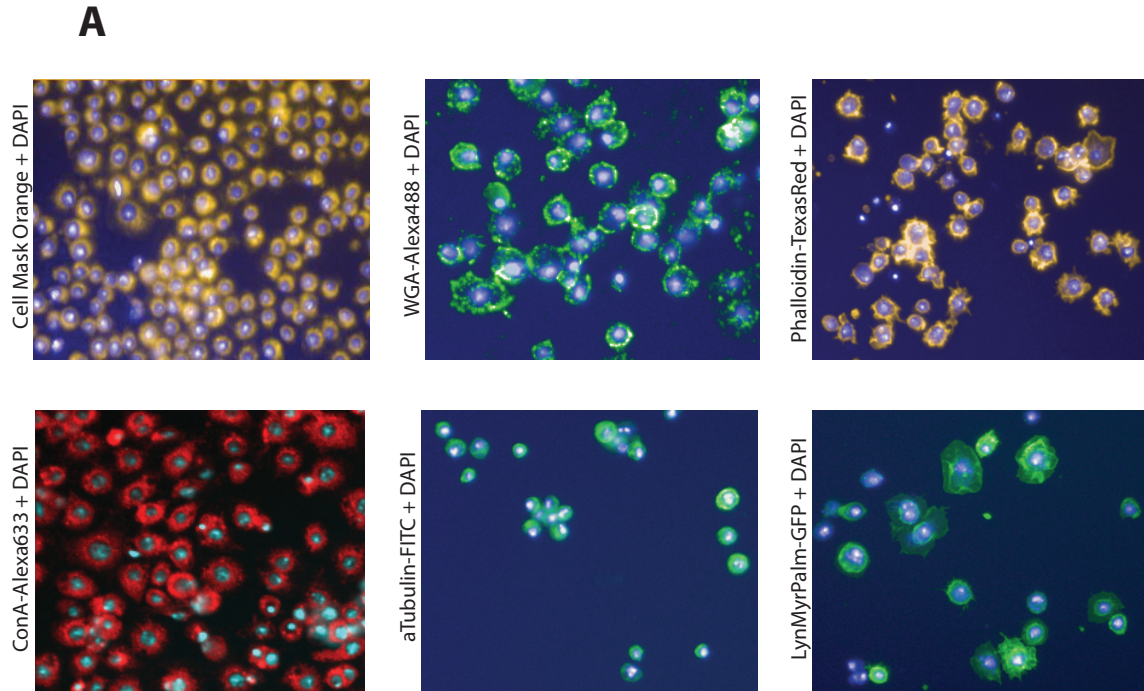
non entourée de couleur. Une fois les noyaux détectés, le logiciel détecte ensuite les cytoplasmes marqués ici au Cell Mask Orange. Notons que le Cell Mask Orange est reconnu comme étant un marqueur de membrane plasmique grâce à sa lente diffusion. Cependant, dans les cellules S2, le Cell Mask Orange marque le cytoplasme, malgré les différentes optimisations réalisées (résultats non montrés). Le même processus est donc répété où chaque cytoplasme détecté est entouré d'un cercle de couleur différente. La figure 10 montre que le logiciel semble incapable de séparer les cellules adjacentes. Ce problème de détection est majeur car il fausse les pourcentages de multinucléation créant ainsi un biais. En effet, plusieurs cellules juxtaposées sont entourées d'une couleur identique. Pour remédier à ce problème, au moins deux solutions sont envisageables : les membranes cellulaires pourraient être marquées de manière explicite, et les cellules pourraient être séparées les unes des autres. Ces méthodes alternatives pourraient faciliter la détection des cytoplasmes par le logiciel et seront donc exploitées plus bas.

Un marquage de la membrane plasmique explicite plutôt que cytoplasmique pourrait permettre au logiciel *Harmony* de détecter des formes circulaires délimitées. Pour ce faire, plusieurs marqueurs membranaires et cellulaires ont été testés.

### **3.2.1 Optimisation du marquage cellulaire pour une meilleure détection par le logiciel**

Afin d'améliorer la détection des cytoplasmes des cellules S2 par le logiciel *Harmony*, différents marqueurs cellulaires sont testés (figure 11A et 11B). Le Cell Mask Orange, un marqueur membranaire amphiphile qui traverse la membrane plasmique de manière lente, est utilisé en guise de contrôle, étant donné que les quantifications précédentes ont été faites sur des cellules marquées par ce procédé. Des marqueurs membranaires du nom de Wheat Germ Agglutinin (WGA) et Concanavalin-A (ConA), couplées à des fluorophores, se lient aux lectines de la membrane plasmique<sup>45,46</sup> et permettent leur détection. En effet, WGA est couplée à Alexa 488 et la ConA est couplée à l'Alexa 633. Ces deux marqueurs devraient permettre au logiciel *Harmony* d'identifier de manière claire la membrane plasmique et de détecter ainsi les cellules de manière précise. La phalloïdine, une drogue qui stabilise les filaments d'actine et empêche leur dépolymérisation, est couplée au fluorophore TexasRed et est employée pour marquer le cytosquelette. Ce marquage ne permet pas l'identification des membranes plasmiques de manière explicite mais étant donné que le phosphoinositide principal qui

compose la membrane plasmique le PI(4,5)P2 et que ce dernier régule l'actine, il serait possible de distinguer la membrane plasmique <sup>36</sup>. Un anticorps contre l' $\alpha$ -tubulin couplé au fluorophore FITC est également utilisé. Il est possible grâce à l' $\alpha$ -tubulin marquée ou à la phalloïdine de distinguer des cellules en division étant donné que le cytosquelette se réarrange lors de la mitose<sup>1</sup>. Il est, par opposition, impossible d'identifier une division cellulaire avec le Cell Mask Orange qui semble marquer la totalité du cytoplasme. Étant donné qu'une cellule en mitose peut soit réussir ou échouer la cytokinèse, il est difficile de savoir si cette division donnera lieu à une seule cellule multinucléée ou deux cellules distinctes. Les marquages de la tubulin ou des filaments d'actine rendent cette tâche plus simple. Finalement, afin de marquer la membrane plasmique de manière plus directe, une lignée stable de cellules S2 exprimant LynMyrPalm-GFP est générée puis testée. En effet, Lyn est une tyrosine kinase de la famille Src <sup>47</sup> et Myr et Palm sont des modifications post-traductionnelles des lipides (myristoylation et palmitoylation respectivement) permettant l'ancrage à la membrane plasmique. Les images acquises par le microscope sont ensuite analysées par le logiciel *Harmony* et le pourcentage de multinucléation est calculé (figure 11 B).



**Figure 11.** Le marquage des cellules au Cell Mask Orange permet la meilleure détection par le logiciel *Harmony*

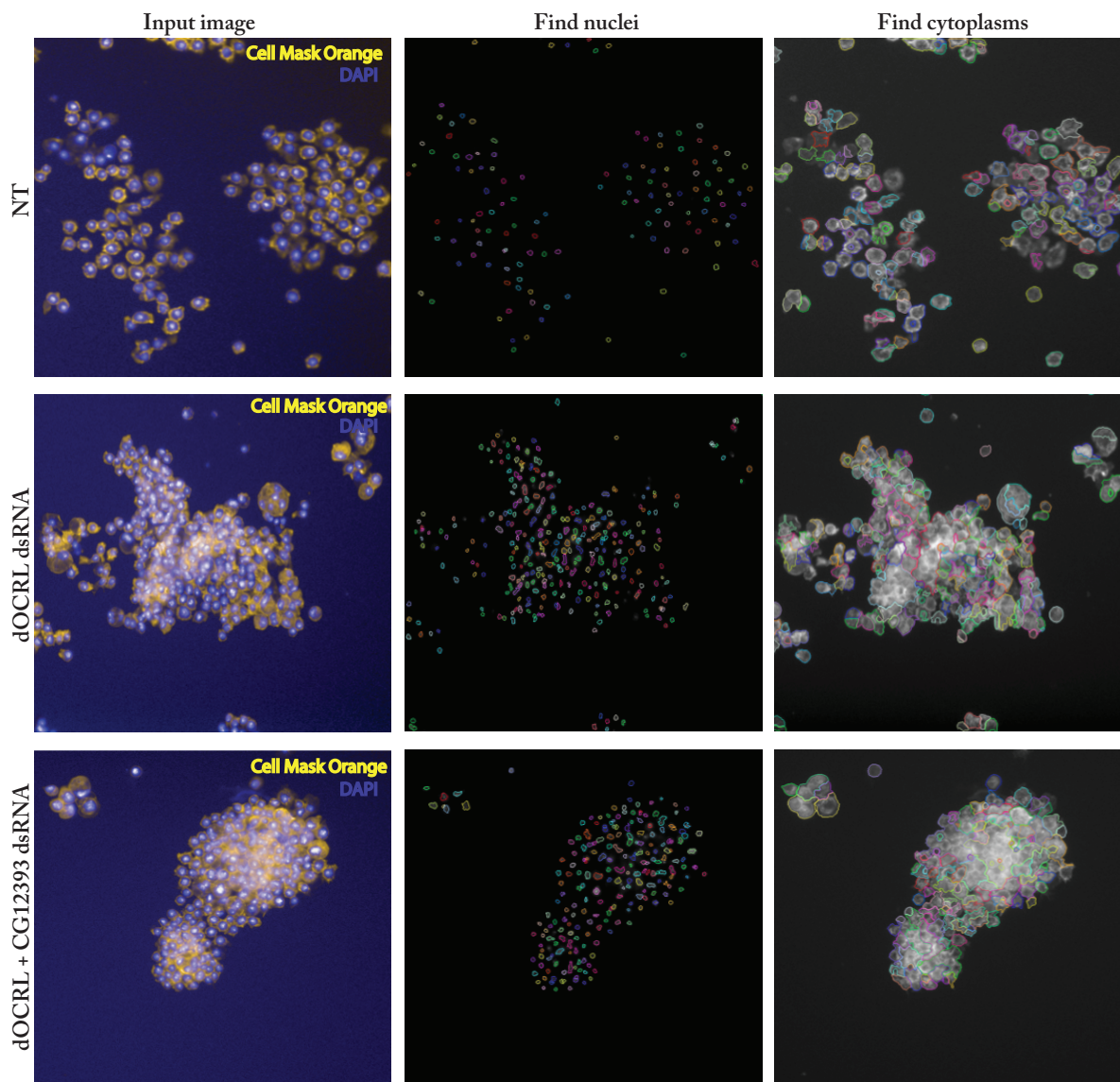
A) Images obtenues par microscopie des cellules S2 NT marquées avec différents marqueurs cellulaire, membranaire ou de cytosquelette ainsi que par le Dapi. B) Des cellules S2 NT et où dOCRL est déplété sont marquées avec les marqueurs utilisés dans l'essai représenté dans le panneau A et les images acquises par le microscope Operetta sont analysées par le logiciel Harmony. Le pourcentage de multinucléation est calculé pour chacune des différentes conditions. Des comptages manuels sont également réalisés afin d'estimer l'exactitude des pourcentages calculés de manière automatique par le logiciel.

Les marquages permettant l'identification claire et précise de la membrane plasmique des cellules sont les WGA et LynMyrPalm-GFP (figure 11A). Il est possible d'identifier, de manière moins claire, les membranes des cellules marquées à la phalloïdine. Cependant, les autres marqueurs semblent marquer la totalité des cytoplasmes. Afin de vérifier si le logiciel peut discriminer entre des cellules multinucléées et des cellules NT, des cellules S2 sont traitées selon les conditions expérimentales optimisées plus haut. Elles sont ensuite fixées et marquées. Le logiciel *Harmony* analyse ensuite les images obtenues (figure 11B). Il semble y avoir peu de divergences entre les comptages manuels et automatiques pour les cellules marquées au Cell Mask Orange. Les pourcentages de multinucléation pour ces mêmes cellules NT et déplétées pour dOCRL sont statistiquement les plus significatifs.

Le marquage permettant la meilleure discrimination entre les cellules NT et celles déplétées pour dOCRL par le logiciel *Harmony* est le marquage au Cell Mask Orange. Ce dernier permet également au logiciel de calculer le pourcentage de multinucléation le plus proche de celui estimé manuellement.

La différence de pourcentage de multinucléation entre les cellules NT et dOCRL-déplété est faible dans les cellules marquées au WGA. Même si l'écart entre ces pourcentages est bas, il n'est pas possible de conclure que le logiciel distingue mal les cellules multinucléées marquées au WGA car l'écart entre les pourcentages de multinucléation, même que plus grand, est présent dans les comptages manuels. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les cellules sont marquées au WGA avant d'être fixées, ce qui pourrait faire éclater les cellules multinucléées fragilisées mais ne peut pas expliquer le pourcentage élevé de multinucléation des cellules NT. Les cellules marquées à la phalloïdine montrent une différence prononcée de multinucléation entre les cellules NT et celles où dOCRL est déplété. Cependant, la différence entre les comptages manuels et automatiques est plus grande que celle entre les cellules marquées au Cell Mask Orange. Le pourcentage de multinucléation des cellules traitées au dOCRL dsRNA et marquées à la phalloïdine est le plus élevé de tous les marquages, même pour les comptages manuels. Il ne devrait, théoriquement, pas y avoir de différence entre les pourcentages de multinucléation des cellules traitées, peu importe le marquage, à moins que ce dernier ait été fait sur des cellules non fixées. Les pourcentages de multinucléation des cellules traitées et marquées à la ConA

et à la tubulin sont bas. Dans le cas des cellules exprimant LynMyrPalm-GFP, le faible pourcentage de multinucléation peut probablement être expliqué par le fait que dans les cellules transfectées, certaines voies de signalisation peuvent être suractivées et altérer ainsi le phénotype observé. En conclusion, le marquage permettant la meilleure détection des cellules par le logiciel d'analyse d'image est le Cell Mask Orange. Étant donné que ce marquage était utilisé dans les essais plus haut et qu'aucun autre marquage ne permet une meilleure détection des cellules, la séparation de ces dernières est requise. En effet, les cellules S2 ont tendance à s'agréger, surtout lorsqu'elles sont traitées avec des dsRNAs dirigés dOCRL et CG12393 dsRNA (figure 12).



**Figure 12. L'agrégation des cellules empêche le logiciel *Harmony* de détecter les cytoplasmes de manière précise**

Le logiciel *Harmony* ne détecte pas les cytoplasmes des cellules traitées au dsRNA de manière précise à cause d'agrégaions cellulaires.

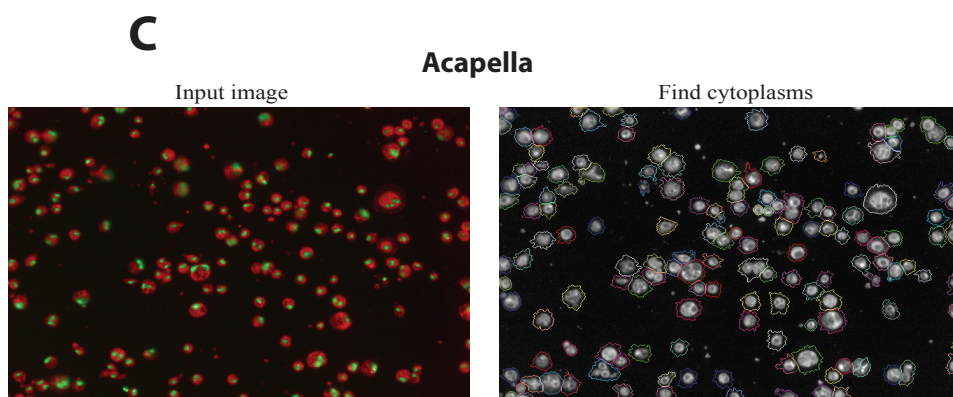
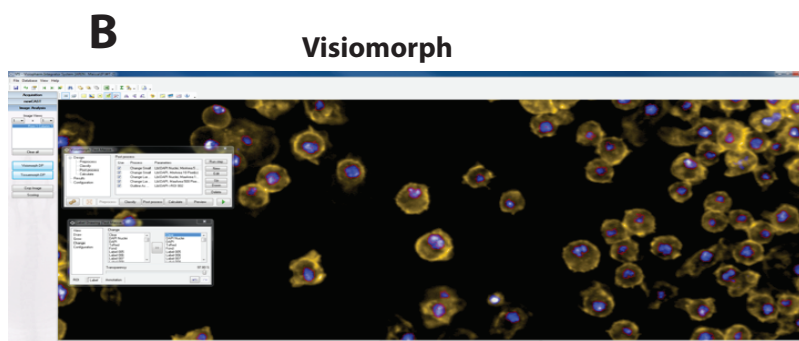
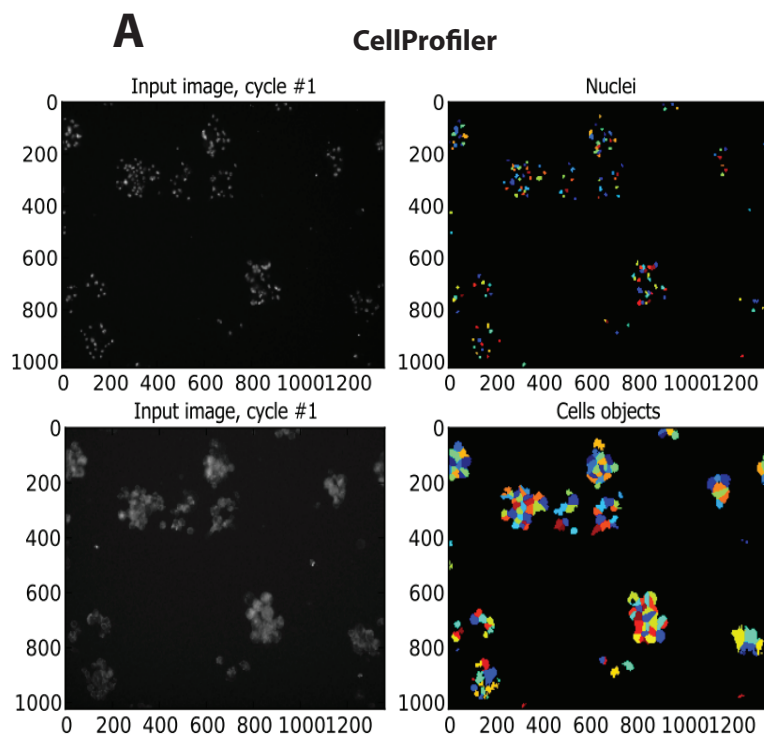
L'agrégation des cellules empêche la détection adéquate des cellules par le logiciel *Harmony*. Le logiciel délimitant mal les cellules, estime un pourcentage de multinucléation qui pourrait être biaisé. Ce problème est contourné par l'optimisation de l'algorithme du logiciel de façon à ce que la taille et la circularité des cellules soient calculées et que les valeurs aberrantes ne soient pas prises en considération dans le calcul du pourcentage de multinucléation. Cependant, dans des conditions telles que la double



déplétion de dOCRL et CG12393, les cellules semblent moins nombreuses et des débris cellulaires sont visibles dans le milieu de culture. Étant donné que les agglomérats ne sont pas pris en considération dans les calculs de multinucléation et que les cellules restantes sont peu nombreuses, la valeur statistique des résultats est diminuée. Une alternative serait de prendre d'avantage d'images au microscope pour les conditions en question, mais augmenterait considérablement le nombre de fichiers à analyser par le logiciel *Harmony*. Pour remédier à ce problème, les cellules doivent être séparées les unes des autres, sans toutefois induire l'éclatement de ces dernières. Tout d'abord, d'autres logiciels d'analyse d'image sont testés.

### **3.2.2 Utilisation de différents logiciels d'analyse d'image pour une meilleure détection des cellules S2**

Face aux difficultés engendrées par le logiciel *Harmony* dans la détection des cellules S2, différents logiciels d'analyse d'images sont testés. Le logiciel *CellProfiler Analyst* est un logiciel accessible à source ouverte qui offre la possibilité d'exercer le logiciel-même à détecter l'objet désiré. Il est alors mis à l'épreuve dans la détection des cellules S2 (figure 13A). La plateforme d'histologie de l'Institut se sert d'un logiciel d'analyse d'images nommé *Visiomorph* pour détecter les cellules dans les coupes histologiques étudiées. Nous avons donc tiré profit de l'expertise de la plateforme dans l'utilisation de ce logiciel pour nous aider à détecter les cellules S2 (figure 13B). La plateforme de criblage de l'Institut met un autre microscope confocal utile pour les criblages à haut débit, à la disposition des chercheurs. Ce microscope du nom de *Opera* de Perkin Elmer, couplé au logiciel d'analyse d'images *Acapella*, est également testé pour sa capacité à détecter les cellules S2 (figure 13C).



**Figure 13.** Le logiciel *Acapella* est celui qui permet la meilleure détection des cellules

A) Le logiciel CellProfiler Analyst ne permet pas une détection exacte des cellules S2. B) Le logiciel Visiomorph est incapable de détecter plusieurs noyaux dans une même cellule. C) Le logiciel Acapella permet une détection plus précise des cellules que celle avec le logiciel Harmony.

Le logiciel *CellProfiler Analyst* ne réussit pas à discerner les cellules de manière précise mais semble plutôt les segmenter de manière excessive (figure 13A) (voir annexes). Nous avons tiré profit de l'expertise de la plateforme de Bioinformatique de l'Institut mais le temps que nous pouvions allouer à cet essai dans le cadre de l'étude était limité. Malgré les nombreuses optimisations, le logiciel *Visiomorph* ne détecte pas les noyaux cellulaires de manière précise ce qui n'a pas permis de passer à l'étape subséquente qui était la détection des cellules (figure 13B). La figure 13C montre que le logiciel *Acapella*, couplé au microscope *Perkin Elmer* de l'Institut réussit à détecter les cellules d'une manière plus précise que le logiciel *Harmony* utilisé précédemment. Étant donné qu'il serait impossible d'obtenir un résultat parfait où le logiciel détecterait sans erreur toutes les cellules multinucléées, nous avons décidé que le résultat obtenu avec le logiciel *Acapella* était satisfaisant. L'algorithme du logiciel *Acapella* a donc été optimisé (voir annexe) et sera utilisé pour analyser les images des essais subséquents.

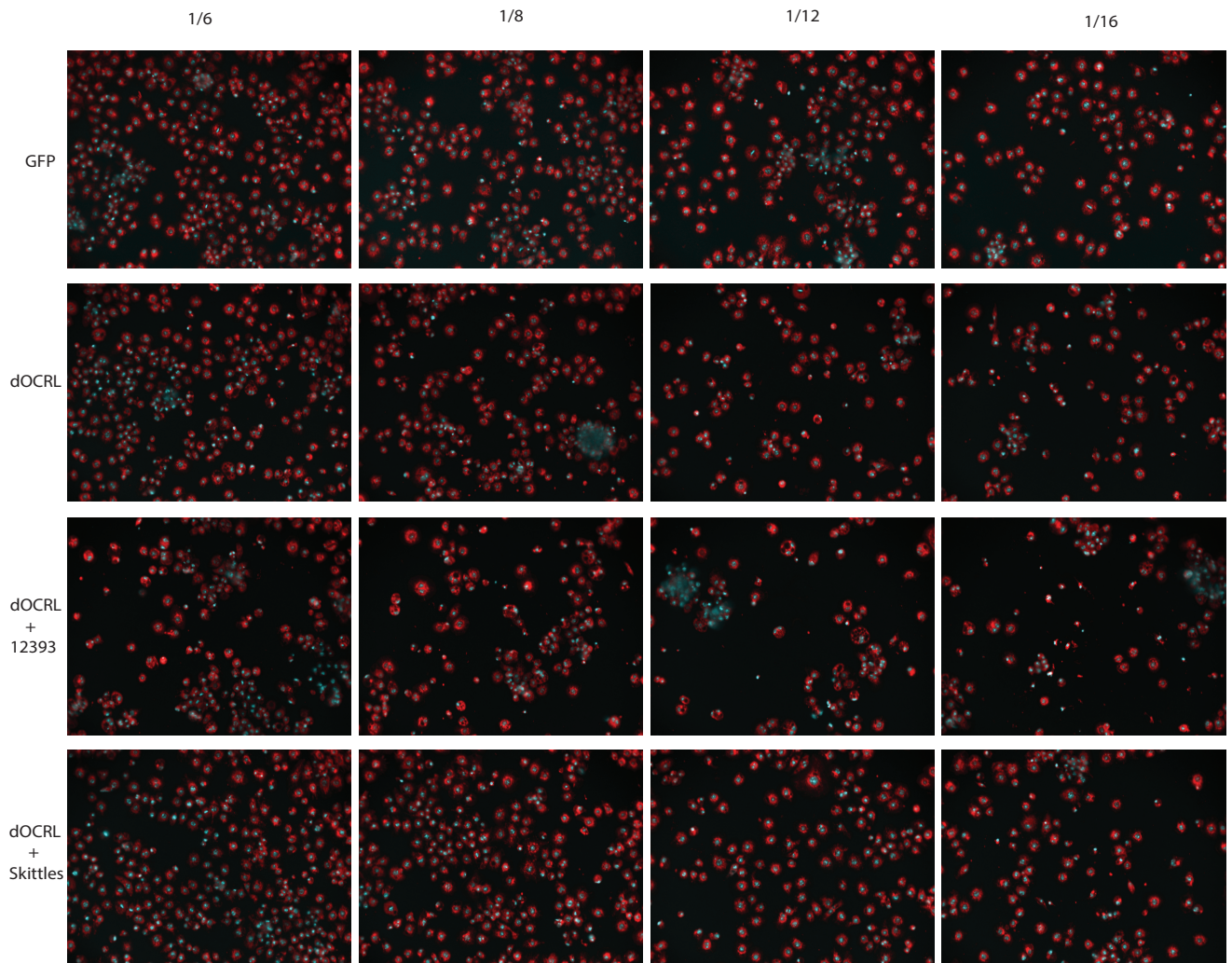
Dans le but d'améliorer la détection des cellules par le logiciel *Acapella*, surtout dans les conditions de co-déplétion de dOCRL et CG12393 où les cellules forment des agrégats, il est question de séparer les cellules de manière automatisée.

### **3.2.3 Séparation automatisée des cellules S2 pour une meilleure détection automatique des cytoplasmes**

Les cellules S2 ont tendance, lorsque traitées avec certains dsRNA, de former des agrégats (figure 12). Ce phénomène est également observé dans les cellules NT, mais à une plus petite proportion (figure 12). Ces agrégats empêchent le logiciel de détecter les cellules de manière efficace ce qui introduit des biais dans l'étude.

Afin de séparer les cellules et d'éviter les agrégats en vue d'une meilleure détection automatique, les cellules sont diluées. En effet, étant donné que les cellules S2 semblent mieux croître lorsqu'elles sont confluentes, ensemercer une petite quantité de cellules au jour 0 du traitement induit un taux élevé de cellules mortes et de débris cellulaires (résultats non montrés). Pour contourner ce problème et

permettre au logiciel *Acapella* une bonne détection des cellules, ces dernières sont ensemencées à confluence et ensuite décollées et diluées après 6 jours de traitement. Dans le cadre d'un criblage génomique, une dilution manuelle des cellules serait fastidieuse et peu précise. Un robot Biomek utilisé à la plateforme de criblage de l'Institut, permet de pipeter de petits volumes avec une grande précision. Plusieurs dilution sont alors testées (figure 14).



**Figure 14. La dilution 1/12 effectuée par le robot Biomek permet une bonne séparation des cellules S2**

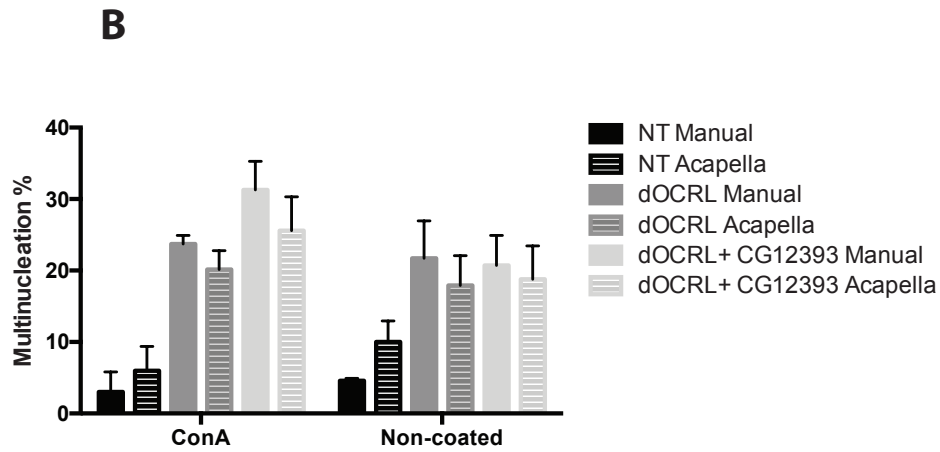
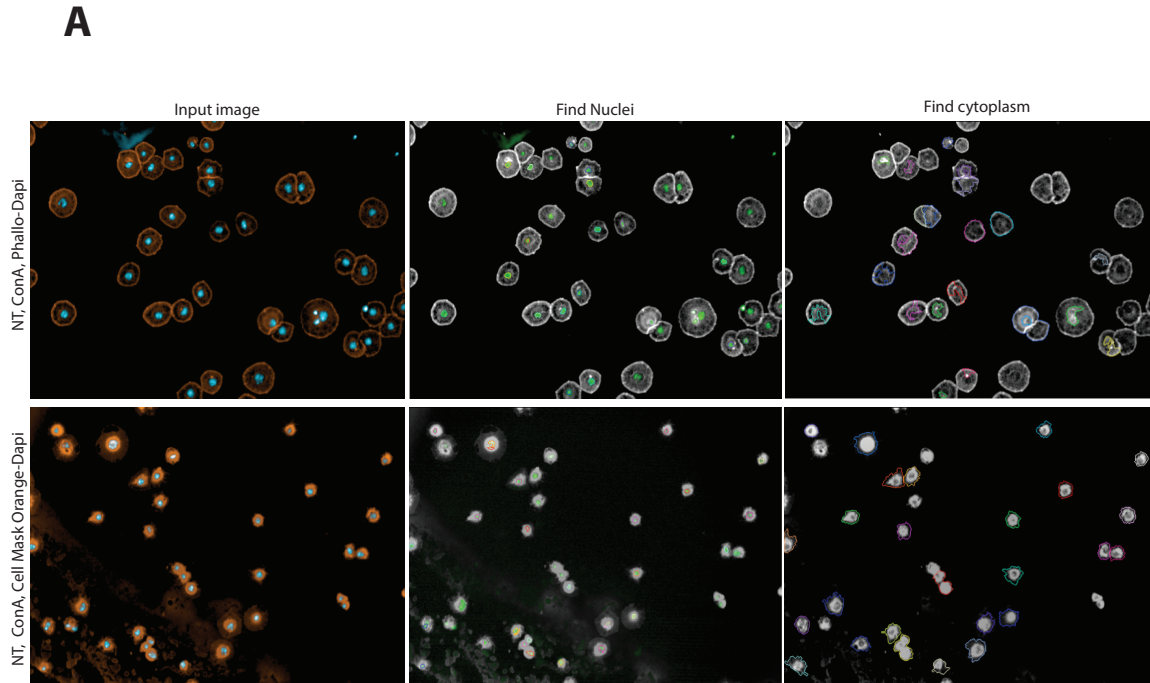
Les cellules S2 sont traitées au dsRNA et diluées de manière automatisée avec le robot Biomek, afin de diminuer la confluence cellulaire.

Comme attendu, plus les dilutions sont grandes, plus les cellules sont espacées. Il est cependant important de s'assurer qu'il reste suffisamment de cellules par champ pour permettre une analyse statistiquement robuste et significative. Notons que les cellules co-déplétées pour dOCRL et CG12393 semblent moins confluentes. En effet, un taux élevé de débris cellulaires est retrouvé dans le milieu de culture. La dilution 1/16 ne permettant pas l'obtention d'un nombre élevé de cellules par champ (figure 14) la dilution 1/12 est plus adéquate pour des conditions similaires à celles de la co-déplétion de dOCRL et CG12393. En effet, en diluant les cellules 12 fois, elles sont éparpillées pour l'ensemble des conditions testées. Par conséquent, cette dilution sera retenue. Il est important de noter que les cellules multinucléées sont fragilisées et peuvent éclater plus facilement, lors de la suspension. Ceci pourrait faire varier, de manière biaisée, les pourcentages de multinucléation. Cette hypothèse est testée et le pourcentage de cellules multinucléées resuspendues est calculé et comparé à des cellules multinucléées non resuspendues. Les résultats montrent que l'éclatement des cellules multinucléées a lieu mais à de faibles proportions et n'est donc pas significatif (résultats non montrés).

### **3.2.4 Utilisation de la ConA pour rendre les cellules adhérentes et faciliter leur détection automatique**

Afin d'améliorer la détection des cellules S2 par le logiciel d'analyse d'images *Acapella*, l'adhésion des cellules à la surface des puits des plaques de culture est forcée par l'utilisation de la ConA (figure 15A). Étant donné l'effet mitogène que possède la ConA sur certaines cellules dont les lymphocytes T <sup>2,48</sup>, il est important d'évaluer l'effet de cette molécule sur la multinucléation des cellules S2 (figure 15B). L'évaluation en question est faite de façon manuelle c'est à dire que grâce aux images acquises par le microscope, les cellules multinuclééesensemencées sur des puits couverts et non-couverts de ConA sont identifiées à l'œil nu et comptées manuellement, afin de s'assurer de l'exactitude des valeurs obtenues. La capacité de détection des cellules multinucléées adhérentes sur de la ConA, du logiciel *Acapella*, est donc mise à l'épreuve où un comptage manuel permet l'estimation de l'exactitude des valeurs obtenues.

Étant donné que lors de l'adhésion des cellules S2 à une surface induite de ConA, des lamelles circulaires d'actine se forment <sup>5,49</sup>, les cellules S2 sont marquées à la phalloïdine ainsi qu'au Cell Mask Orange et la capacité de détection du logiciel *Acapella* est mise à l'épreuve (figure 15A).



**Figure 15. La Con-A améliore la détection par le logiciel *Acapella* des cellules S2 marquées au Cell MAsk Orange, sans altérer le pourcentage de multinucléation**

A) Cellules S2 NT marquées au Cell Mask Orange ou à la phalloïdin-TexasRed, dans des puits couverts de Con-A. Images acquises au microscope Opera de Perkin Elmer et analysées par le logiciel Acapella. B) Quantifications manuelle et automatique avec le logiciel Acapella du pourcentage de cellules multinucléées NT, déplétées pour dOCRL et co-déplétées dOCRL et CG21393, dans des puits couverts et non-couverts de Con-A.

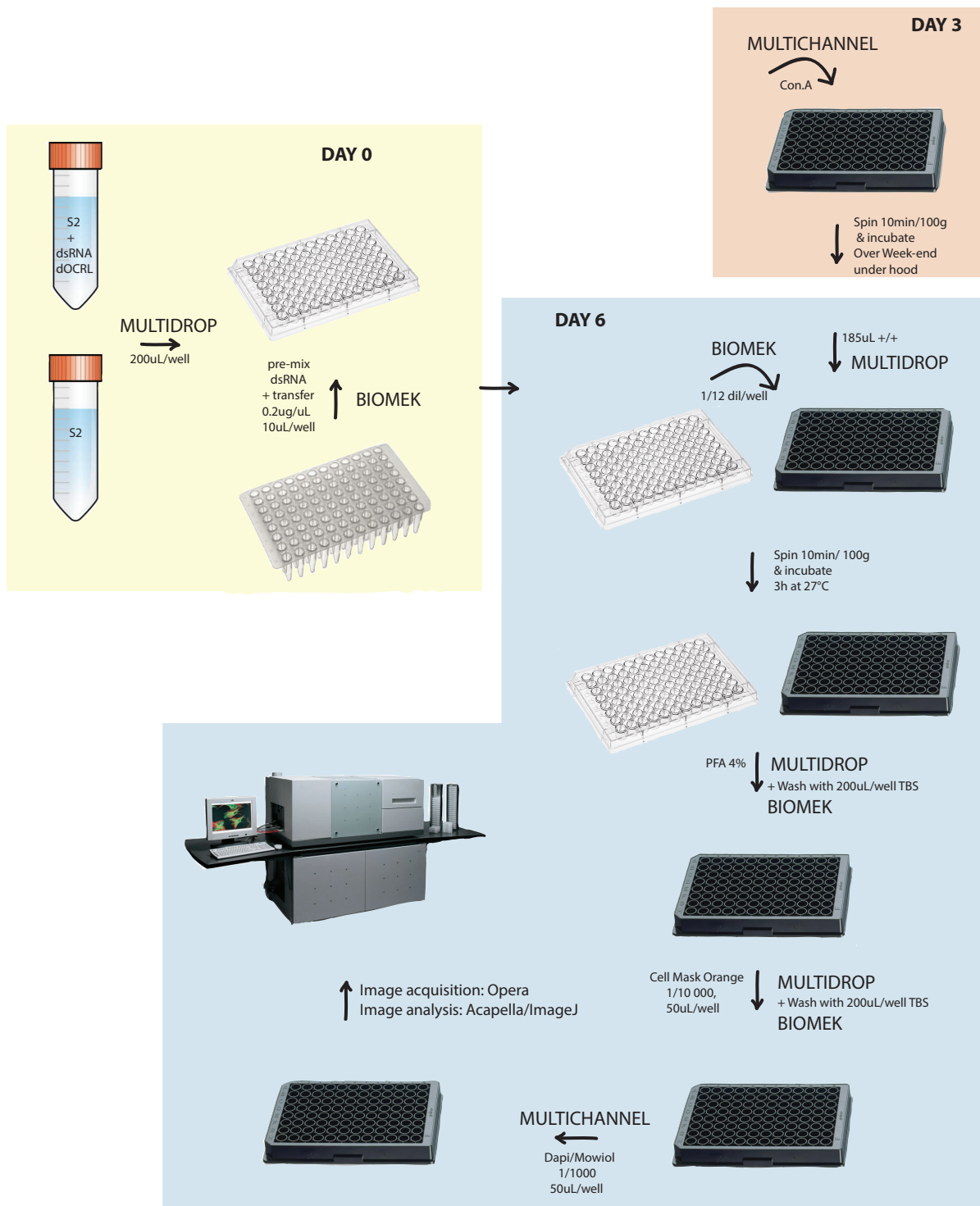
Les cellules dans des puits couverts de Con-A et marquées au Cell Mask Orange sont détectées de manière plus précise par le logiciel *Acapella*, que celles marquées à la phalloïdin-TexasRed. Elles paraissent cependant moins étalées et plus rondes (figure 15A). Le pourcentage de multinucléation calculé de manière automatique sur la figure 15B est inférieur à celui estimé manuellement, montrant que le logiciel ne semble pas détecter toutes les cellules multinucléées. Cependant, les pourcentages de multinucléation comptés de façon manuelle dans les puits non couverts sont également bas montrant que le problème n'est pas issu du logiciel mais serait plutôt un problème expérimental. Il n'est donc pas possible d'affirmer que le logiciel *Acapella* n'est pas en mesure d'identifier de manière précise, des cellules multinucléées.

Notons que dans les puits couverts de ConA, les pourcentages de multinucléation des cellules sont plus élevés que ceux des cellules traitées ensemencées sur des puits non couverts de ConA. Il est possible que la ConA induise une légère multinucléation des cellules. Cependant, les pourcentages de multinucléation des cellules ensemencées sur des puits non couverts de ConA sont plus bas que ceux observés dans les essais plus haut, surtout pour les cellules co-déplétées pour dOCRL et CG12393. Il n'est donc pas possible d'affirmer avec certitude que l'augmentation de multinucléation soit due à la ConA. De plus, cette augmentation reste dans les normes des valeurs observées dans les essais précédents, par conséquent, la ConA sera utilisée dans les essais subséquents.

### **3.3 Plan expérimental détaillé des étapes du criblage génomique en dsRNA, dans des cellules S2 de Drosophile**

Les optimisations réalisées plus haut sont regroupés dans un schéma illustrant la marche expérimentale à suivre pour un criblage génétique par dsRNA dans les cellules S2 de Drosophile, afin de déterminer les régulateurs de l'homéostasie du PI(4,5)P2 qui interagissent de manière fonctionnelle avec dOCRL.





**Figure 16. Schématisation du plan expérimental optimisé pour le criblage en dsRNA à haut-débit dans les cellules S2**



Les cellules seront donc traitées, fixées et marquées comme illustré ci-dessus. L'analyse des images acquises par le microscope Opera sera réalisée par le logiciel Acapella.

Afin de s'assurer que les optimisations et les mises au point permettent de réaliser un criblage qui générera des résultats cohérents et non biaisés, un test nommé Z-factor (Z') est réalisé. Dans ce test, il est nécessaire que les conditions expérimentales et analytiques se rapprochent le plus possible de celles du criblage qui sera effectué, d'où l'importance des mises au point préalablement réalisées. Pour que ce test soit significatif, chaque condition doit être répétée expérimentalement, le plus de fois possible. Jusque-là, les cellules NT servaient de contrôle pour le phénotype de multinucléation. Afin de montrer que le traitement au dsRNA en tant que tel ne cause pas de multinucléation, les cellules contrôles sont traitées au dsRNA ciblant la GFP. Les autres contrôles seront donc une augmentation et une diminution du pourcentage de multinucléation par rapport à celle engendrée par la simple déplétion de dOCRL. Ils seront répétés sur l'ensemble des puits d'une plaque 96 puits, et dans chaque puits, plusieurs champs seront analysés. Le pourcentage de cellules multinucléées sera ensuite calculé par le logiciel *Acapella* et il sera possible de calculer le Z' et estimer la robustesse de l'essai.

### 3.4 Calcul du Z' afin d'estimer la robustesse de l'essai

Le Z', un calcul mathématique prenant en considération l'écart-type et les moyennes des différents contrôles positifs et négatifs de l'essai est alors calculé (figure 17).

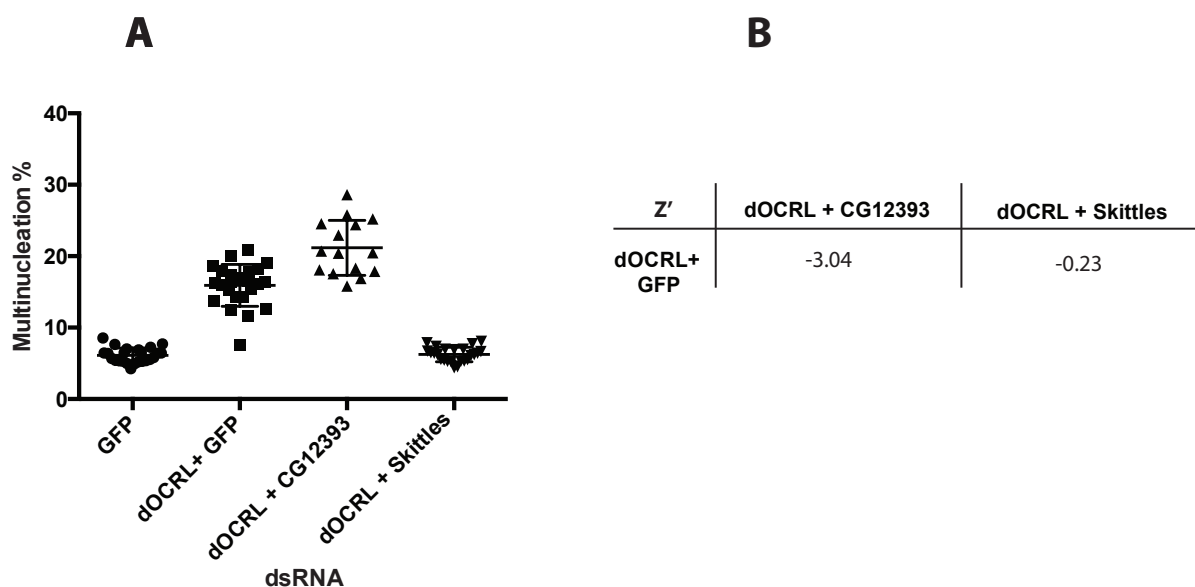
$$Z' = 1 - \left| \frac{3\sigma_+ + 3\sigma_-}{\mu_+ - \mu_-} \right|$$

**Figure 17. Formule mathématique du Z' prenant en considération les moyennes des contrôles positifs et négatifs au numérateur et les écarts types des mêmes contrôles au dénominateur<sup>6,50</sup>**

Cette formule servira à calculer les différents Z' de cette étude. Rappelons que dans notre cas, le contrôle négatif sera le pourcentage de multinucléation des cellules traitées aux dsRNA ciblant la GFP et dOCRL. Il y aura deux contrôles positifs, un pour une augmentation du

pourcentage de multinucléation par rapport à celle engendrée par la simple déplétion de dOCRL, et une autre pour la diminution du pourcentage de multinucléation par rapport à la même déplétion de dOCRL. Par conséquent, il y aura deux  $Z'$  : un pour la double déplétion dOCRL et CG12393 par rapport à la simple déplétion dOCRL, et un autre pour la double déplétion de dOCRL et Skittles par rapport à la simple déplétion dOCRL.

Afin de calculer le  $Z'$ , chaque condition est répétée afin de s'assurer que la moyenne et l'écart-type sont représentatifs des valeurs obtenues. Les cellules S2 sont donc traitées avec du dsRNA et sont ensuite fixées et marquées par immunofluorescence. Les images sont acquises par le microscope à haut-débit *Opera* et analysées par le logiciel *Acapella*. Le pourcentage de multinucléation est alors calculé par le logiciel (figure 18A). Le  $Z'$  est ensuite calculé suivant la formule de la figure 17, (figure 18B). Une valeur optimale du  $Z'$  serait proche de 1. Ceci voudrait dire que les écart-types sont peu élevés et que la différence des moyennes entre les contrôles est grande.



**Figure 18. Les  $Z'$  calculés ne permettent pas la mise en place d'un criblage robuste**

A) Pourcentages de multinucléation calculés par Acapella pour les conditions contrôles testées. B) Les valeurs de  $Z'$  calculés pour les différentes conditions, sont inférieures à celles espérées. En effet, des valeurs de moins de 0.5 indiquent généralement un essai peu robuste.

Les cellules déplétées pour dOCRL et celles co-déplétées pour dOCRL et CG12393 montrent de grandes variations quant aux pourcentages de multinucléation de chacune de manière respective. Ceci

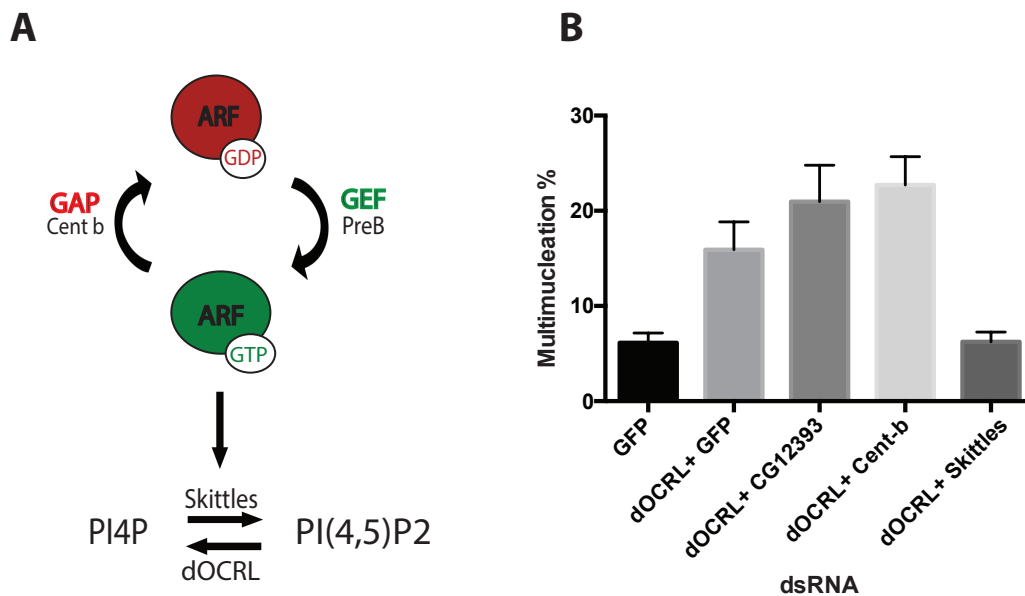
pourrait être une des causes pour lesquelles la valeur du  $Z'$  pour l'augmentation du phénotype est bas (-3.04). Cette variation pourrait être due à un problème expérimental, cependant, les pourcentages de multinucléation de la GFP et ceux de la co-déplétion de dOCRL et Skittles varient peu, montrant que le problème survient lorsque le taux cellules multinucléées est élevé. Nous avons noté précédemment que les cellules multinucléées avaient tendance à éclater lorsqu'elles étaient resuspendues mais avons conclu que cette variation n'était pas significative. Une autre raison pour laquelle le  $Z'$  du contrôle de l'augmentation du phénotype est si bas, est que les pourcentages de multinucléation des deux contrôles positif et négatif pris en considération dans le calcul du  $Z'$  ne sont pas assez différents. En effet, dans la formule du  $Z'$  la différence des moyennes de multinucléation est au dénominateur. Par conséquent, plus sa valeur est grande, plus la fraction est petite, et plus la valeur du  $Z'$  est grande. Il faudrait donc augmenter l'écart entre les pourcentages de multinucléation de dOCRL et le contrôle de l'augmentation du phénotype. Ceci sera discuté plus bas. Les pourcentages de multinucléation des cellules traitées au dsRNA GFP semblent moins varier. Un résultat similaire est observable pour les cellules co-déplétées pour dOCRL et Skittles et expliquerait le fait que le  $Z'$  du contrôle de la diminution du phénotype (dOCRL/Skittles) soit plus élevé.

Dans le but d'augmenter la valeur du  $Z'$  du contrôle de l'augmentation du phénotype, il est nécessaire de trouver un gène, qui, lorsque co-déplété avec dOCRL, induirait un plus haut pourcentage de multinucléation que celui induit par la co-déplétion de dOCRL et CG12393.

### **3.4.1 Augmentation de l'écart entre les pourcentages de multinucléation des contrôles négatif et positif d'augmentation de la multinucléation pour augmenter la valeur du $Z'$**

Les protéines se liant au GTP de la famille Arf jouent un rôle important dans le trafic membranaire mais aussi dans le remodelage du cytosquelette. Ceci fait d'eux des joueurs clé dans la morphologie, la migration et la division cellulaire. Arf1 liée au GTP par exemple, recrute des protéines d'enveloppe au Golgi. Son activité est régulée par des GAP (GTPase Activating Protein) qui cessent son activité en hydrolysant le GTP et des GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) qui, au contraire, l'activent en déplaçant le GDP pour du GTP<sup>5,51</sup>. Il a été observé que Arf1 activait la PI5K dans les cellules de tissu rénal de singe<sup>6,52</sup>. Par conséquent, il est probable que Arf1 active Skittles dans

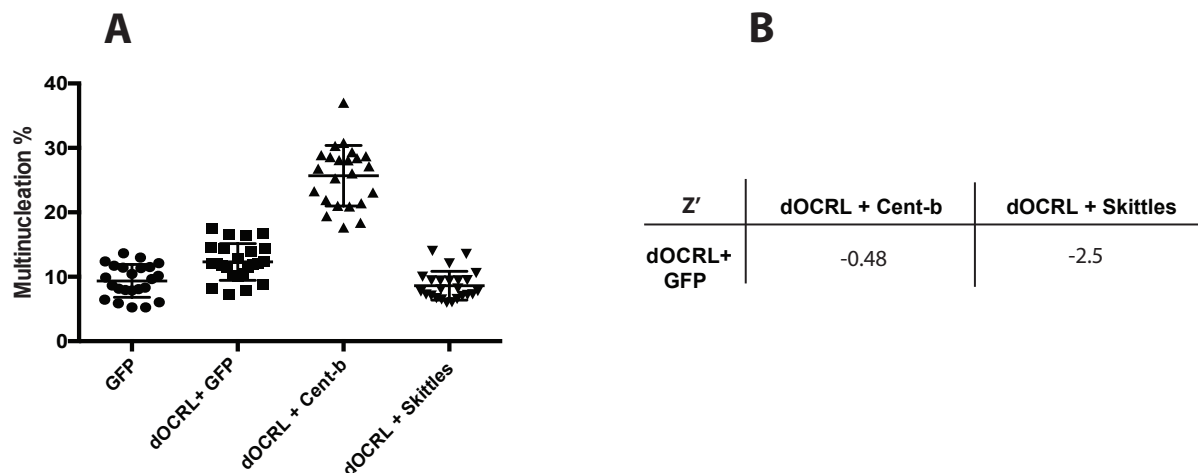
les cellules S2. Centaurin- $\beta$  (Cent- $\beta$ ), une Arf1-GAP, favorise donc une conformation inactive de Arf1<sup>5,51 13,53</sup>. Par conséquent, une déplétion de Cent- $\beta$  induirait l'activité de la PI5K Skittles et augmenterait ainsi la quantité de PI(4,5)P2 dans les cellules (figure 19A et 19B). Or si dOCRL est également déplété dans ces mêmes cellules, la déphosphorylation du PI(4,5)P2 serait grandement réduite, aggravant ainsi le phénotype de multinucléation. La co-délétion de Cent- $\beta$  et dOCRL pourrait donc servir de contrôle « aggravant » du phénotype, par opposition à la co-délétion de Skittles et dOCRL qui diminue le phénotype de multinucléation (figure 9 C). De manière théorique, cette augmentation de phénotype devrait être plus importante que celle induite par la co-délétion de CG12393 et dOCRL et pourrait ainsi élargir l'écart entre le pourcentage de multinucléation causé par la simple déplétion de dOCRL de celui causé par la co-délétion de Cent- $\beta$  et dOCRL. En effet, plus l'écart entre les contrôles est élevé, plus le Z-factor est proche de la valeur 1 indiquant qu'il est possible de détecter plus de cibles car la fenêtre de détection est plus large.



**Figure 19. La déplétion de Cent- $\beta$  favoriserait l'activation de Arf1 et de la PI5-Kinase Skittles**

A) Représentation schématique de l'effet potentiel de la Cent- $\beta$  sur les niveaux PI(4,5)P2. Ce schéma est hypothétique et est présentement en cours de validation au laboratoire. B) Quantification de la co-délétion de dOCRL et Cent- $\beta$  par dsRNA, dans des cellules S2.

N'ayant pas obtenu de Z-factor favorables à un essai à haut-débit, nous avons testé, en guise de contrôle de l'augmentation du phénotype, la co-déplétion Cent- $\beta$  et dOCRL (figure 19A et 19B). En effet, la co-déplétion de dOCRL et de Cent- $\beta$  augmente le pourcentage de multinucléation des cellules S2 par rapport à celles déplétées pour dOCRL uniquement, augmentant ainsi l'écart entre les pourcentages de multinucléation des deux conditions (figure 18A). Ceci améliore la valeur du Z-factor du contrôle d'aggravation du phénotype. Cette co-déplétion en question induit un pourcentage de multinucléation plus élevé que celui détecté par *Acapella* pour la co-déplétion de dOCRL et CG12393. Ceci montre que la co-déplétion de dOCRL et Cent- $\beta$  peut augmenter la valeur du Z' de l'augmentation du phénotype de multinucléation. Il sera donc utilisé dans une deuxième tentative de calcul du Z' (figure 20). Cette augmentation améliorerait l'écart entre les pourcentages de multinucléation des cellules déplétées pour dOCRL et permettrait l'obtention des valeurs de Z-factor plus élevées dans le cas d'une aggravation du phénotype de multinucléation.



**Figure 20. La co-déplétion dOCRL et Cent- $\beta$  augmente la valeur du Z' correspondant à l'augmentation du phénotype de multinucléation, mais reste plus basse qu'attendu**

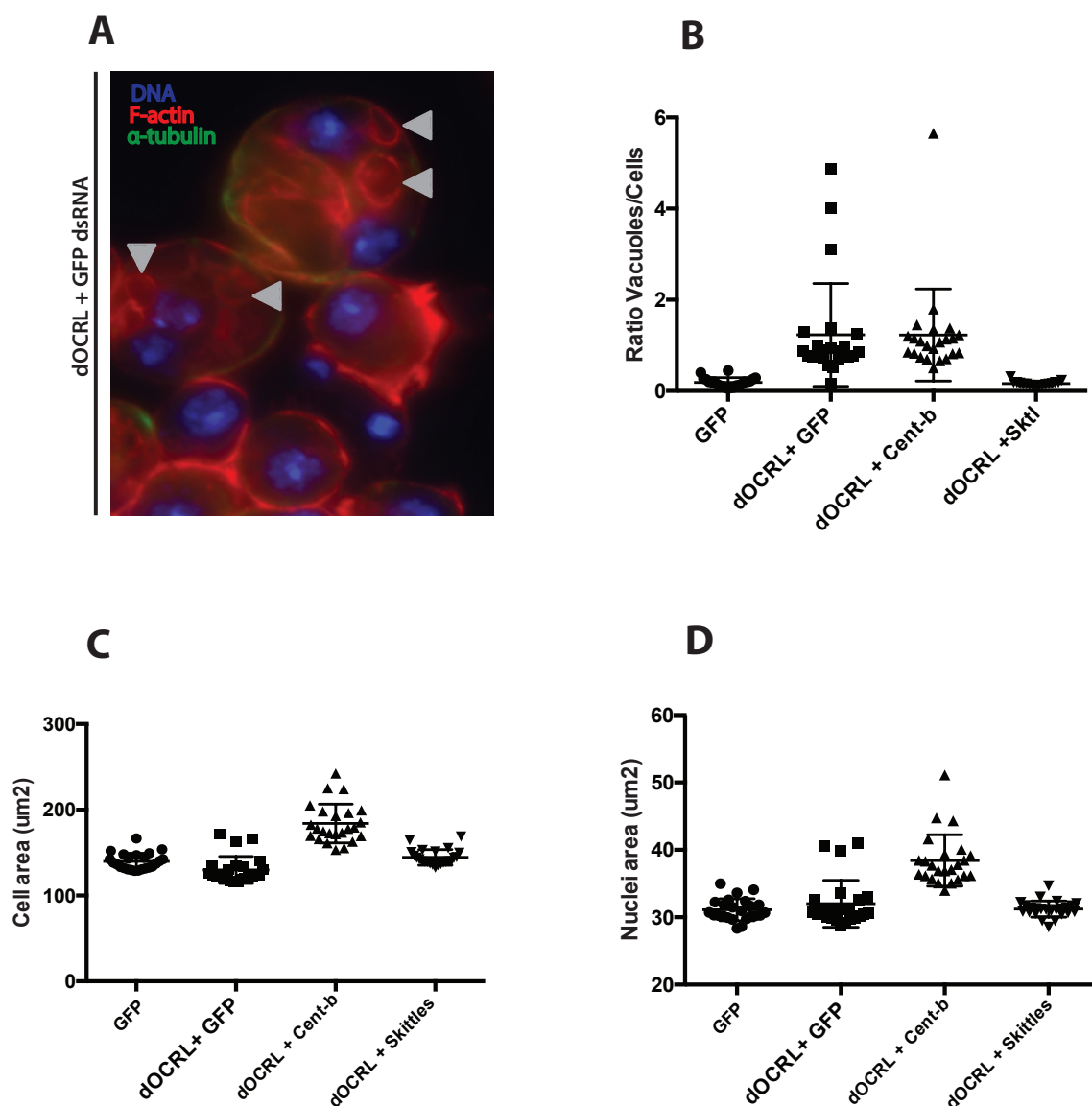
A) Pourcentage de multinucléation des différents contrôles lors d'une deuxième tentative de calcul du Z'. B) Calcul des Z' en utilisant la co-déplétion de dOCRL et Cent- $\beta$  en guise de contrôle de l'augmentation du pourcentage de multinucléation.

Les variations des pourcentages de multinucléation au sein de la condition dOCRL/ Cent- $\beta$  sont élevées nous menant une fois de plus vers un problème de détection des cellules multinucléées ou un problème d'éclatement des cellules. Pour vérifier s'il s'agit de cellules qui explosent lors de leur resuspension, il est nécessaire de compter, manuellement, les pourcentages de multinucléation. Notons également que les pourcentages de multinucléation des cellules déplétées pour dOCRL sont plus bas que ceux attendus. Ceci ne peut être dû à l'état des cellules car pour tous les essais réalisés, les cellules étaient toutes au même passage. L'efficacité du dsRNA dOCRL est testée par immunobuvardage (figure non montrée) qui montre que ce dsRNA diminue significativement l'expression de dOCRL. Les variations des pourcentages de multinucléation au sein des mêmes conditions (GFP et dOCRL/Skittles) varient respectivement. Étant donné que l'essai est entièrement automatisé, les variations d'un puits à un autre devraient être minimales. Cette différence ne peut être expliquée. L'essai devrait être répété.

Les valeurs peu élevées des Z-factor calculés démontrent le manque de robustesse de la quantification de la multinucléation, d'autres phénotypes induits par la déplétion de dOCRL par dsRNA dans les cellules S2 sont étudiés. En effet, il est possible de prendre avantage des nombreux phénotypes engendrés par la déplétion de dOCRL dans les cellules S2, de manière simultanée. Ceci pourrait augmenter l'exactitude des résultats obtenus et augmenter ainsi la robustesse de l'essai. Rappelons que le phénotype de multinucléation est une conséquence d'une mauvaise localisation et d'une accumulation de PI(4,5)P2 sur des endomembranes dans les cellules traitées, causant ainsi un échec de cytotinèse. Les cellules S2 déplétées pour dOCRL ont une taille supérieure aux cellules sauvages <sup>2,15</sup>. Différencier les cellules d'une plus grande taille, contenant un nombre élevé de vacuoles (cellules déplétées pour dOCRL) de celles qui en contiennent moins (cellules déplétées pour GFP), pourrait être une avenue prometteuse qui mènerait à des valeurs de Z-factor supérieures à celles obtenues (figure 21A). Grâce au logiciel Image J, le ratio nombre de vacuoles/ nombre de cellules est estimé pour chacun des contrôles de l'étude (figure 21 panneau B). Le logiciel *Acapella* permet de calculer l'aire des cellules détectées ainsi que celui de leur(s) noyaux (figure 21C et 21D).

### **3.4.2 Combinaison de plusieurs phénotypes différents afin d'augmenter la valeur des Z'**

Il est possible, en combinant plusieurs phénotypes ou paramètres différents pour les mêmes conditions, d'augmenter la robustesse du criblage. En effet, l'existence de plusieurs paramètres permettant de mieux différencier des cellules où l'homéostasie du PI(4,5)P2 est altérée de celles où l'homéostasie est rétablie, augmente la valeur statistique de l'essai. Dans notre cas, la combinaison de tous les phénotypes documentés et induits par la déplétion de dOCRL dans les cellules S2 <sup>2,8</sup> pourrait non seulement augmenter pertinence statistique des résultats engendrés par le criblage, mais pourrait aussi permettre la détection d'un plus grand éventail de régulateurs potentiels de l'homéostasie du PI(4,5)P2. En effet certains régulateurs pourraient, par exemple, induire l'accumulation de PI(4,5)P2 sur des endomembranes ou structures vacuolaires, sans toutefois impliquer la multinucléation. Dans ce cas, l'homéostasie du PI(4,5)P2 serait dérégulée mais la cytotinèse pourrait avoir lieu de manière efficace, si les régulateurs ciblés affectent spécifiquement le PI(4,5)P2 mais affectent également, par un mécanisme inconnu, la cytotinèse. Dans ce cas hypothétique, les régulateurs de l'homéostasie du PI(4,5)P2 n'auraient pas pu être identifiés en analysant simplement le phénotype de multinucléation, mais pourraient être détectés par l'analyse additionnelle des structures vacuolaires (figure 21 ).



**Figure 21. L'exploitation des différents phénotypes induits par la déplétion de dOCRL ne semble pas augmenter l'écart des valeurs obtenues pour les différentes conditions étudiées**

A) La déplétion de dOCRL entraîne une accumulation de PI(4,5)P2 sur des endomembranes formant des structures vacuolaires <sup>2,17</sup>. Ce phénotype pourrait être exploité afin d'augmenter la valeur de Z'. B) Quantification des structures vacuolaires en question. La déplétion de dOCRL induit une augmentation de la taille des cellules traitées <sup>2,3</sup>. Quantification de la taille des cellules C) et de leurs noyaux D) afin d'augmenter la valeur du Z'.

Les quantifications des différents phénotypes ne montrent pas de différence significative d'une condition à une autre. En effet, l'écart entre les valeurs des ratios vacuoles/cellules par exemple, est



petit. Ceci ne permet donc pas d'utiliser ce paramètre dans un criblage à haut débit. Il faudrait trouver une manière plus sensible qui permet une meilleure détection des vacuoles. Il serait également possible d'optimiser le logiciel *ImageJ* pour une meilleure détection. Pour ce faire, il faudrait allouer d'avantage de temps et avoir de plus grandes connaissances en la matière.

## 4. Discussion

Les fonctions des PI sont essentielles à la cellule<sup>3,5</sup>. Il est donc important que ces lipides soient régulés de manière efficace. Les kinases et phosphatases, qui gardent un équilibre dynamique entre les différentes concentrations de PI, contribuent au maintien de l'homéostasie de ces derniers. Un débalancement de cet équilibre peut mener à de nombreuses maladies comme le cancer et le syndrome de Lowe<sup>8,54</sup>. Sachant que les deux PI les plus abondants dans la cellule sont le PI(4,5)P2 et PI(4)P, une perte de l'homéostasie d'un de ces PI a des effets drastiques sur la cellule<sup>5,19</sup>. Comprendre les protéines impliquées dans l'homéostasie du PI(4,5)P2, nous aideraient à restaurer cette homéostasie mais surtout à mieux comprendre les différentes voies de signalisation impliquées dans ce processus. Nous avons pris avantage que la multinucléation soit un phénotype évident et facilement détectable pour optimiser un essai de criblage à haut-débit. Cependant, la question essentielle qu'il faut se poser est la suivante : est-ce que ce phénotype de multinucléation est bel et bien lié à la perte de l'homéostasie du PI(4,5)P2? Cette question a été adressée lorsque le pourcentage de multinucléation a été augmenté (figure 12) et diminué (figure 9) en agissant sur les enzymes régulant la « fabrication » du PI(4,5)P2. Notons que la co-déplétion de dOCRL et CG12393 induisant une augmentation du phénotype n'est pas une preuve directe que le phénotype est associé à l'homéostasie du PI(4,5)P2. Étant donné qu'il a été montré que CG12393 et dOCRL interagissent ensemble et que CG12393 pourrait avoir des fonctions dans le trafic membranaire<sup>21,44</sup>, l'augmentation de la multinucléation suite à la co-déplétion de dOCRL et CG12393 pourrait donc être liée à l'homéostasie du PI(4,5)P2. Il est donc possible, si l'on contrôle l'augmentation et la diminution de la multinucléation, de détecter des protéines impliquées dans l'homéostasie du PI(4,5)P2, interagissant fonctionnellement avec dOCRL. Il aurait été utile de co-dépléter dOCRL-CG12393 et dOCRL-Skittles individuellement, dans des cellules exprimant la sonde tubby-GFP. Ceci aurait permis la confirmation du lien entre le phénotype observé et l'homéostasie du PI(4,5)P2.

Les calculs de  $Z'$  effectués étaient décevants à cause d'une petite variabilité entre les moyennes du contrôle positif d'augmentation de multinucléation, et le contrôle négatif (figure 18), ou encore à cause de la grande variabilité de l'écart-type entre les différents pourcentages de multinucléation au sein d'une même condition (figure 20). Nous avons mentionné de la possibilité de l'éclatement des cellules traitées

au dsRNA, dans la section « Résultats » plus haut, suggérant que la variation observée au sein du même échantillon est probablement due à des limitations analytiques. Ces limitations rendent impossibles l'automatisation et le lancement du criblage dans de telles conditions. En effet, les résultats obtenus des suites d'un tel criblage seraient sans valeur scientifique. Il est cependant possible d'envisager un criblage à haut-débit par cytométrie en flux où les cellules seraient triées selon qu'elles soient polyploïdes ou non. Rappelons que les cellules multinucléées sont polyploïdes par opposition aux cellules mononucléées. Ceci pourrait être une alternative au criblage en utilisant l'immunofluorescence pour détecter les cellules multinucléées. Cependant, il ne faudrait pas oublier qu'un tel essai favoriserait d'avantage l'éclatement des cellules qui pourrait alors devenir un facteur limitant.

Au lieu d'utiliser les mécanismes cellulaires impliqués dans la déplétion partielle de l'expression de gènes par dsRNA, il est possible de profiter de nouvelles techniques comme l'édition des gènes par CRISPR. Une banque d'ARN guide peut être achetée ou synthétisée et permettrait la réalisation du criblage par CRISPR.

Il est également possible de réaliser le criblage *in vivo*, en croisant des mutants générés de *Drosophile*.

Peu importe la méthode favorisée pour la réalisation du criblage, une confirmation du criblage est nécessaire et permet d'identifier les faux-positifs. Dans notre optique de criblage par dsRNA, une séquence différente du même gène pourrait être ciblée par un autre dsRNA généré.

Les gènes identifiés peuvent interagir fonctionnellement avec dOCRL sans toutefois être liés à l'homéostasie du PI(4,5)P2. Il est donc nécessaire de réaliser un crible secondaire où les gènes retenus seraient co-déplétés avec dOCRL dans cellules exprimant la sonde tubby-GFP. Ceci permettrait de visualiser la quantité mais également la localisation du PI(4,5)P2 suite à la déplétion.

Même si l'aspect analytique nous empêche de réaliser, avec les outils que nous possédons, un criblage à haut-débit, la réalisation d'un criblage à petite échelle reste toutefois possible. En effet, il serait intéressant de co-dépléter dOCRL et certains gènes cibles qui pourraient affecter l'homéostasie du PI(4,5)P2 comme les gènes impliqués dans le trafic membranaire, la régulation du cytosquelette, les protéines localisés sur le *midbody* lors de la cytokinèse, ou encore l'autophagie. Dans cette optique, les optimisations expérimentales réalisées et présentés dans la partie « Résultats » de ce mémoire, pourraient être utilisées pour arriver à cette fin. Les images acquises au microscope pourraient être analysées de façon manuelle, étant donné le nombre peu élevé de candidats qui seraient testés.

## 5. Conclusion

Les optimisations expérimentales réalisées ont permis la mise en place d'un protocole expérimental pouvant être suivi dans le cadre d'un criblage dsRNA à haut-débit, dans des cellules S2, pour identifier les interacteurs de dOCRL impliqués dans la régulation de l'homéostasie du PI(4,5)P2. Même si les optimisations analytiques ne sont pas au point, un criblage sur des gènes candidats régissant certaines fonctions cellulaires peuvent être testés manuellement. Il serait également possible d'utiliser d'autres techniques menant à la réalisation du criblage à haut-débit. Les travaux présentés dans ce mémoire nous rapprochent néanmoins de l'identification de régulateurs de l'homéostasie du PI(4,5)P2. Une meilleure compréhension de cette homéostasie nous aiderait à identifier des processus cellulaires impliqués dans cette homéostasie et nous permettrait de mieux comprendre la régulation du cytosquelette, la division cellulaire, et les mécanismes menant au syndrome de Lowe.

## Bibliographie

1. Solinet, S. *et al.* The actin-binding ERM protein Moesin binds to and stabilizes microtubules at the cell cortex. *J. Cell Biol.* **202**, 251–260 (2013).
2. Ben El Kadhi, K., Roubinet, C., Solinet, S., Emery, G. & Carréno, S. The inositol 5-phosphatase dOCRL controls PI(4,5)P2 homeostasis and is necessary for cytokinesis. *Curr. Biol.* **21**, 1074–1079 (2011).
3. Yin, H. L. & Janmey, P. A. Phosphoinositide Regulation of the Actin Cytoskeleton. *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 761–789 (2003).
4. Dambournet, D. *et al.* Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis. *Nat Cell Biol* **13**, 981–988 (2011).
5. Balla, T. Phosphoinositides: Tiny Lipids with Giant Impact on Cell Regulation. *Physiol. Rev.* **93**, 1019–1137 (2013).
6. Echard, A. Phosphoinositides and cytokinesis: the ‘PIP’ of the iceberg. *Cytoskeleton (Hoboken)* **69**, 893–912 (2012).
7. Spiegel, S., Foster, D. & Kolesnick, R. Signal transduction through lipid second messengers. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 159–167 (1996).
8. Martin, T. F. Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 231–264 (1998).
9. Toker, A. Phosphoinositides and signal transduction. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 761–779 (2002).
10. Bissig, C. & Gruenberg, J. Lipid Sorting and Multivesicular Endosome Biogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a016816–a016816 (2013).
11. Krauss, M. & Haucke, V. Phosphoinositide-metabolizing enzymes at the interface between membrane traffic and cell signalling. *EMBO Rep.* **8**, 241–246 (2007).
12. De Matteis, M. A. & Godi, A. Protein-lipid interactions in membrane trafficking at the Golgi complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1666**, 264–274 (2004).
13. Bökenkamp, A. & Ludwig, M. The oculocerebrorenal syndrome of Lowe: an update. *Pediatr. Nephrol.* (2016). doi:10.1007/s00467-016-3343-3
14. Lemmon, M. A. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nature Publishing Group* **9**, 99–111 (2008).
15. Korn, E., Carlier, M. & Pantaloni, D. Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science* **238**, 638–644 (1987).
16. Lassing, I. & Lindberg, U. Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature* **314**, 472–474 (1985).
17. Di Paolo, G. & De Camilli, P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651–657 (2006).
18. Itoh, T. & De Camilli, P. Membrane trafficking: Dual-key strategy. *Nat Cell Biol* **429**, 141–143 (2004).
19. Carréno, S. *et al.* Moesin and its activating kinase Slik are required for cortical stability

- and microtubule organization in mitotic cells. *J. Cell Biol.* **180**, 739–746 (2008).
20. Shewan, A., Eastburn, D. J. & Mostov, K. Phosphoinositides in cell architecture. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a004796 (2011).
  21. Roubinet, C. *et al.* Molecular networks linked by Moesin drive remodeling of the cell cortex during mitosis. *J. Cell Biol.* **195**, 99–112 (2011).
  22. Cauvin, C. & Echard, A. Phosphoinositides: Lipids with informative heads and mastermind functions in cell division. *Biochim. Biophys. Acta* **1851**, 832–843 (2015).
  23. Machicoane, M. *et al.* SLK-dependent activation of ERMs controls LGN–NuMA localization and spindle orientation. *J. Cell Biol.* **205**, 791–799 (2014).
  24. Fisher, B. D. & Mueller, G. C. Gamma-hexachlorocyclohexane inhibits the initiation of lymphocyte growth by phytohemagglutinin. *Biochem. Pharmacol.* **20**, 2515–2518 (1971).
  25. D'Avino, P. P. *et al.* Interaction between Anillin and RacGAP50C connects the actomyosin contractile ring with spindle microtubules at the cell division site. *J. Cell. Sci.* **121**, 1151–1158 (2008).
  26. Bement, W. M., Benink, H. A. & Dassow, von, G. A microtubule-dependent zone of active RhoA during cleavage plane specification. *J. Cell Biol.* **170**, 91–101 (2005).
  27. Sagona, A. P. & Stenmark, H. Cytokinesis and cancer. *FEBS Lett.* **584**, 2652–2661 (2010).
  28. Schneider, I. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* **27**, 353–365 (1972).
  29. Rogers, S. L. & Rogers, G. C. Culture of *Drosophila* S2 cells and their use for RNAi-mediated loss-of-function studies and immunofluorescence microscopy. *Nat Protoc* **3**, 606–611 (2008).
  30. Gamper, N. & Shapiro, M. S. Target-specific PIP(2) signalling: how might it work? *J. Physiol. (Lond.)* **582**, 967–975 (2007).
  31. Crick, F. Central dogma of molecular biology. *Nature* **227**, 561–563 (1970).
  32. Karpala, A. J., Doran, T. J. & Bean, A. G. D. Immune responses to dsRNA: implications for gene silencing technologies. *Immunol. Cell Biol.* **83**, 211–216 (2005).
  33. Lam, J. K. W., Chow, M. Y. T., Zhang, Y. & Leung, S. W. S. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Molecular Therapy — Nucleic Acids* **4**, e252– (2015).
  34. Pirruccello, M. & De Camilli, P. Inositol 5-phosphatases: insights from the Lowe syndrome protein OCRL. *Trends in Biochemical Sciences* **37**, 134–143 (2012).
  35. De Leo, M. G. *et al.* Autophagosome–lysosome fusion triggers a lysosomal response mediated by TLR9 and controlled by OCRL. *Nat Cell Biol* **18**, 839–850 (2016).
  36. Logan, M. R. & Mandato, C. A. Regulation of the actin cytoskeleton by PIP2 in cytokinesis. *Biol. Cell* **98**, 377–388 (2006).
  37. Ben El Kadhi, K., Emery, G. & Carréno, S. The unexpected role of *Drosophila* OCRL during cytokinesis. *Commun Integr Biol* **5**, 291–293 (2012).
  38. Ramkumar, N. & Baum, B. Coupling changes in cell shape to chromosome segregation. *Nature Publishing Group* **17**, 511–521 (2016).
  39. Serres, M. P. *et al.* p27(Kip1) controls cytokinesis via the regulation of citron kinase activation. *J. Clin. Invest.* **122**, 844–858 (2012).
  40. De Santis Puzzonia, M., Gonzalez, L., Ascenzi, S., Cundari, E. & Degrossi, F. Tetraploid cells produced by absence of substrate adhesion during cytokinesis are limited in their proliferation and enter senescence after DNA replication. *Cell Cycle* **15**,

- 274–282 (2016).
41. Giot, L. *et al.* A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* **302**, 1727–1736 (2003).
  42. Guruharsha, K. G. *et al.* A protein complex network of *Drosophila melanogaster*. *Cell* **147**, 690–703 (2011).
  43. Noakes, C. J., Lee, G. & Lowe, M. The PH domain proteins IPIP27A and B link OCRL1 to receptor recycling in the endocytic pathway. *Mol. Biol. Cell* **22**, 606–623 (2011).
  44. Swan, L. E., Tomasini, L. & Pirruccello, M. Two closely related endocytic proteins that share a common OCRL-binding motif with APPL1. in (2010).
  45. Richardson, S. C. W. *et al.* The use of fluorescence microscopy to define polymer localisation to the late endocytic compartments in cells that are targets for drug delivery. *J Control Release* **127**, 1–11 (2008).
  46. Pratt, R. M. & Gibson, W. A. An immunofluorescent technique for observing the binding of concanavalin A to frozen tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* **21**, 229–232 (1973).
  47. Raucher, D. *et al.* Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. *Cell* **100**, 221–228 (2000).
  48. Reeke, G. N. *et al.* in *Concanavalin A* **55**, 13–33 (Springer US, 1975).
  49. Rogers, S. L., Wiedemann, U., Stuurman, N. & Vale, R. D. Molecular requirements for actin-based lamella formation in *Drosophila* S2 cells. *J. Cell Biol.* **162**, 1079–1088 (2003).
  50. Zhang, J., Chung, T. & Oldenburg, K. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* **4**, 67–73 (1999).
  51. Nie, Z. Arf GAPs and membrane traffic. *J. Cell. Sci.* **119**, 1203–1211 (2006).
  52. Jones, D. H. Type I Phosphatidylinositol 4-Phosphate 5-Kinase Directly Interacts with ADP-ribosylation Factor 1 and Is Responsible for Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Synthesis in the Golgi Compartment. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 13962–13966 (2000).
  53. Randazzo, P. A. *et al.* The Arf GTPase-activating protein ASAP1 regulates the actin cytoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 4011–4016 (2000).
  54. Pendaries, C., Tronchère, H., Plantavid, M. & Payrastre, B. Phosphoinositide signaling disorders in human diseases. *FEBS Lett.* **546**, 25–31 (2003).

## **Séquences « building block » des différents logiciels d'analyse d'image utilisés**



## Séquence “building block” du logiciel *Acapella*

- Input image
- Find nuclei
  - Channel Exp2Cam4
  - Method C
  - Output population: Nuclei
- - Calculate morphology properties
    - Population: Nuclei
    - Region: Nucleus
    - Method: Standard
    - Output properties: Nucleus
- Select Population
  - Population: Nuclei
  - Method: Filter by properties,
    - Nucleus Roundness: > 0.7
    - Nucleus Ratio width/length: > 0.4
    - Output population: Nuclei selected
- Find cytoplasm:
  - Channel Ex1Cam2
  - Nuclei: Nuclei Selected
  - Method: E
  - Output population: Cytoplasms
- Calculate morphology properties (2): Population: Cytoplasms
  - Region: Cell
  - Method: Standard
  - Output properties: Cells
- Select population (2):
  - Population: Cytoplasms
  - Method: Filter by properties
    - Cell roundness: >0
    - Cell Ratio width/length > 0.7
    - Output population: Cytoplasms Morphology
- Select Population (3):
  - Population: Cytoplasms Morphology
  - Method: Common Filters
    - Remove Border Objects
    - Output population: Cytoplasms Morphology Border
- Select Population (4):
  - Population: Cytoplasms Morphology Border
  - Method: Filter by properties
    - Number of nuclei >1
    - Output population: Multinucleated Cells
- Define results:
  - Method: List of outputs
    - Population: Nuclei Selected
      - ✓ Nucleus area

- ✓ Nucleus ratio width/length
  - Cytoplasm Morphology Border
  - ✓ Cells area
  - ✓ Cells ratio width/length
- Method: Formula output:
  - Formula:  $(a/b)*100$
  - Variable A: Multinucleated Cells number of nuclei
  - Variable B: Cytoplasm Morphology Border number of objects
  - Output name: % multinucleated cells

## Séquence “building block” du logiciel *Harmony*

- Input image: Stack processing: individual planes  
Flatfield correction: none
- Find nuclei:
  - Channel: DAPI
  - Method: B
    - Common threshold: 0.71
    - Area 5um<sup>2</sup>
    - Split factor: 100.0
    - Individual threshold: 1.00
    - Contrast: 0.4
    - Output population: Nuclei DAPI
- Calculate Morphology properties:
  - Population: Nuclei DAPI
  - Region: Nucleus
  - Method: Standard
    - Area (ok), roundness (ok)
    - Output population: Nucleus
- Select Population:
  - Population: Nuclei DAPI
  - Method: Filter by property:
    - Nucleus roundness>0.75
    - Output population: Nuclei DAPI selected
- Find cytoplasm:
  - Channel: Cy3
  - Nuclei: Nuclei DAPI selected
  - Method: E
    - Common threshold: 0.45
    - Individual threshold: 0.15
    - Output population: MultiNucleated Cells
- Calculate Morphology Properties:
  - Population: Multinucleated cells
  - Region: Cell
  - Method: Standard

- Area (ok)
  - Roundness (ok)
  - Ratio width to length (ok)
  - Output population: CellRoundness
- Select population:
  - Population MultiNucleated Cells
  - Method: Filter by property
    - CellRoundness ratio width/length > 0.67
    - CellRoundness Roundness >0.8
    - Output population: MultiNucleated Cells Roundness selected
- Select population:
  - Population: Multinucleated cells Roundness selected
  - Method: Filter by property
    - Number of nuclei > ou = 2
    - Output population: Nb cells + de 2 noyaux
- Define results:
  - Method: Formula output:  $a/b*100$   
 Variable A: nb cells + de 2 noyaux,  
 Variable B: Multinucleated cells Roundness selected number of objects
  - Method: List of outputs:  
 Toutes les populations plus haut

## Séquence “building block” du logiciel *Image J*

Pour compter le nombre de vacuoles:

- Bio-Formats Import Options: View Stacks with: Image 5D  
     Group files with similar names
- Select fields to be analyzed: *choisir puits*
- Image -> Stacks -> Images to Stacks  
     Title contains: *choisir puits*
- Image -> Adjust -> Threshold  
     Désélectionner “Dark Background”
- Analyze -> Set measurements
  - Area
  - Mean grey value
  - Display label
  - NaN empty cells
- Analyze -> Analyze particles
  - Size: 0- infinity
  - Circularity: 0.00 -1.00
  - Show overlay
  - Display results
  - Exclude on edges

- Summarize

Pour compter le nombre de cellules:

- Bio-Formats Import Options: View Stacks with: Image 5D  
Group files with similar names
- Select fields to be analyzed: *choisir puits*
- Image -> Stacks -> Images to Stacks  
Title contains: *choisir puits*
- Image -> Adjust -> Threshold  
Sélectionner “Dark Background”
- Analyze -> Set measurements
  - Area
  - Mean grey value
  - Display label
  - NaN empty cells
- Analyze -> Analyze particles
  - Size: 5- infinity
  - Circularity: 0.00 -1.00
  - Show outlines
  - Display results
  - Exclude on edges
  - Summarize